

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5789190号
(P5789190)

(45) 発行日 平成27年10月7日(2015.10.7)

(24) 登録日 平成27年8月7日(2015.8.7)

(51) Int.Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 N 1/15 (2006.01)

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/19 (2006.01)

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 1/21 (2006.01)

C 1 2 N 1/21

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 N 5/00 1 0 1

請求項の数 5 (全 57 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2011-528171 (P2011-528171)
 (86) (22) 出願日 平成21年9月24日(2009.9.24)
 (65) 公表番号 特表2012-503478 (P2012-503478A)
 (43) 公表日 平成24年2月9日(2012.2.9)
 (86) 国際出願番号 PCT/CN2009/074178
 (87) 国際公開番号 W02010/034243
 (87) 国際公開日 平成22年4月1日(2010.4.1)
 審査請求日 平成24年9月20日(2012.9.20)
 (31) 優先権主張番号 200810200388.4
 (32) 優先日 平成20年9月24日(2008.9.24)
 (33) 優先権主張国 中国 (CN)

微生物の受託番号 DSMZ DSM 9954

(73) 特許権者 511074084
 シャンハイ インスティテュート オブ
 オーガニック ケミストリー, チャイニー
 ズ アカデミー オブ サイエンス
 中華人民共和国 200032 シャンハ
 イ 345 ルイングルイング ロード
 (74) 代理人 100097456
 弁理士 石川 徹
 (72) 発明者 ウエン ルイウ
 中華人民共和国 200032 シャンハ
 イ 345 ルイングルイング ロード
 (72) 発明者 ナン ジアング
 中華人民共和国 200032 シャンハ
 イ 345 ルイングルイング ロード

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規の遺伝子クラスター

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ハイブリッドポリケチド生成遺伝子クラスター核酸であって、配列番号 1 のSFA生合成遺伝子クラスターにおいて、sfaA、並びに任意に、sfaB、J、M、N、P、Q、L、および0から選択される1つ以上の他の開始単位もしくは前駆体生合成遺伝子が、欠失され、またはその活性を低下させるよう修飾され、またはその基質特異性を変化させるよう修飾もしくは置換されている、前記ハイブリッドポリケチド生成遺伝子クラスター核酸。

【請求項 2】

請求項 1 記載の核酸を1つ以上のプロモーターまたは他の調節エレメントとともに含むベクターであって、前記核酸がDNAである、前記ベクター。

【請求項 3】

請求項 2 記載のベクターを用いて形質転換された宿主細胞。

【請求項 4】

sfaA、並びに任意に、sfaB、J、M、N、P、Q、L、および0から選択される1つ以上の他の開始単位または前駆体生合成遺伝子が、欠失され、またはその活性を低下させるよう修飾され、またはその基質特異性を変化させるよう修飾もしくは置換されている、請求項 3 記載の宿主細胞。

【請求項 5】

請求項 3 または 4 記載の形質転換された宿主細胞を培養することを含む、ポリケチドを製造する方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(導入)

本発明は、サングリフェリンシンターゼをコードする遺伝子クラスター、混合型非リボソームペプチド/ポリケチド化合物の生合成に関与するプロセッシング遺伝子および調節遺伝子、または生合成能の変化した突然変異体を含む新規の単離されたDNA配列と、DNAまたは突然変異体によってコードされるポリペプチドまたはその突然変異体と、該DNAもしくはその突然変異体を含むベクターと、該DNA、その突然変異体、または該ベクターを用いて形質転換された宿主細胞と、サングリフェリン化合物を製造する方法とに関する。また、本発明は、免疫抑制薬、抗ウイルス薬、または心臓保護薬として有用なシクロフィリン阻害活性を有する化合物を提供する。

10

【0002】

(本発明の分野)

本発明は、微生物遺伝子源および遺伝子工学の分野に関し、特に免疫抑制薬サングリフェリンAおよび関連類似体の生合成のための遺伝子クラスターのクローニング、配列分析、インビボでの機能の実証、および使用に関する。

【背景技術】

【0003】

免疫抑制薬サングリフェリンA(SFA)は、ストレプトミセス・フラベオルスまたはストレプトミセス属DSM 9954としても公知のストレプトミセス属A92-308110に由来する混合型ポリケチド-ペプチド天然産物である(これらの名称はすべて、本文書および関連文書(Sanglierらの文献(1999); Fehrらの文献(1999); WO 97/02285))において互換性をもって用いられる。サングリフェリンの20個を超える構造類似体の単離について、現在まで公開されており、SFAは、これらの類似体のうち最大の免疫抑制活性の1つを有する(Kallenらの文献(2005); Sanglierらの文献(1999))。SFAにおいて、22員のマクロライド骨格は構造的に、ポリケチド炭素鎖およびトリペプチド鎖からなる。該ペプチド鎖は、1つの天然アミノ酸: パリン、および2つの非天然アミノ酸: (S)-m-チロシンおよび(S)-ピペラジン酸を含み、アミド結合によって連結されており、アミド結合形成に関与するのはピペラジン酸の位置1における窒素原子であり、該アミド結合形成は、これまで単離された天然産物を含むすべての他のピペラジン酸とは対照的に位置する。加えて、スピロ環状単位は、ポリケチド長鎖によってマクロライドに連結され、バスケット構造を形成する。スピロ環状部分は、中間部に第四級炭素中心を有する9つのキラル中心を含み(SFAは、合計17個を有する。)、このことは、現に説明されている天然産物において独特である。サングリフェリンB、C、D、E、F、G、H、I、J、K、およびLを含む一連の類似体が、ストレプトミセス属A92-308110(ストレプトミセス・フラベオルス)の発酵ブロスから直接単離されている(Fehrらの文献(1999)、Sanglierらの文献(1999)、WO098/07743)。特に、サングリフェリンB(SFB)は、MLRアッセイにおいてSFAよりも高い免疫抑制活性を有することが示されている(Sanglierらの文献(1999))。SFAおよびその大環状類似体の全合成は、多大な尽力で達成された(Sedraniらの文献(2003); Nicolauらの文献(1999); Paquetteらの文献(2002); Metternichらの文献(1999))が、生合成経路に関するインビボおよびインビトロでの具体的な研究は実施されていない。

20

30

40

【0004】

SFAは、強い免疫抑制活性を有し(PowellおよびZhengの文献(2006))、HIVおよびHCV感染を阻害し(Zanderらの文献(2003); Sokolskajaらの文献(2004); Watashiらの文献(2005))、ミトコンドリア膜透過性遷移孔(MPTP)の病理学的開口に起因する重度の心臓細胞死を予防する(Clarkeらの文献(2002))。現在、臨床的用途におけるシクロスポリンA(CsA)、FK506、およびラパマイシンなどの免疫抑制薬と比較して、SFAは、異なる標的エフェクター部位を有しながら類似の機能的機序を有する(Hartelらの文献(2006))、ZhangおよびLiuの文献(2001); Zenkeらの文献(2001))。CsAは、シクロフィリン

50

A (CypA) に結合する (Handschoemacherらの文献 (1984)) のに対し、FK506およびラパマイシンは、FKBPに結合して複合体を形成し (Schreiberの文献 (1991)) ; CsA-CypA複合体およびFK506-FKBP複合体は、同一の標的タンパク質カルシニューリンと相互作用し、それによりカルシニューリンのセリン/トレオニンホスファターゼ活性を阻害し、サイトカインの生成、特にインターロイキン2 (IL-2) の転写を遮断し、最終的にG₀ ~ G₁ 期におけるT細胞の抑止をもたらす (Liuらの文献 (1991)) 。 Rap-FKBP複合体は、プロテインキナーゼFRAP (RAFTまたはmTORとしても公知) と相互作用し (Brownらの文献 (1994)) 、T細胞におけるIL-2受容体のリン酸化を防止し、G₁ ~ S期におけるT細胞の増殖の抑止をもたらす。SFAがシクロフィリンAおよびBなどのシクロフィリンに結合し、かつそれらの異性化酵素活性を阻害することが示されているが (Zenkeらの文献 (2001)) 、SFA-CypA複合体に対するエフェクタータンパク質は現に未知のままである。

10

【 0 0 0 5 】

SFA-CypA複合体のエフェクタータンパク質はまだ発見されていないので、SFAの免疫抑制活性が、SFA-CypA複合体を介して直接仲介されるのではないことが示唆された。過去3年間、多くの科学グループからの研究は、NF- κ BがP53遺伝子上流の転写部位を結合するのを、SFAが競合的に防止して、P53を活性化し、さらに、シグナル経路の下流のシクリンE-cdk2リン酸化を阻害し、それによりIL-2に応じてRbの高いリン酸化を阻害し、細胞をIL-2に対して非感受性にし、細胞をG₁ ~ S期に強制的に留めさせることが示されている (Zhang & Liuの文献, 2001) 。 第二に、未知の機序によって、SFAは、ヒト樹状細胞の増殖に影響を及ぼさない一方で、IL-12p⁷⁰の生成を阻害する (Steinschulteらの文献 (2003)) 。 IL-12p⁷⁰は、Th1細胞およびNK細胞の増殖を調節する上で鍵となる役割を担っており、自然免疫を適応免疫と連結する架橋である。加えて、市販の免疫抑制薬は、腎臓および中枢神経系への重度の毒性副作用をもたらすことができ (Paquetteらの文献 (2002)) 、従って、いくつかの免疫不全疾患における該免疫抑制薬の使用は妨げられている (例えば、カルシニューリンは、CsAおよびFK506の免疫抑制効果および毒性効果の両方の潜在的な原因である。) 代替的な免疫抑制薬または免疫修飾薬を開発する目的で、他のグループは、毒性のより低い有望な免疫抑制薬の新たな生成としてのSFAのいくつかの開発を実施している (W097/02285) 。

20

【 0 0 0 6 】

X線回折によるSFA大環状断片とCypAの間の構造-活性関連性に関する研究は、トリペプチド構造がCypAの溝に埋め込まれており、かつ結合に重要であり、その一方で、位置17および14にそれぞれある側鎖ヒドロキシ基およびカルボニル基は結合に対して必須ではないことを示しており ; 飽和した領域C18-C22由来のトランス-ジエンの除去は、結合定数を7倍低下させ、トランス-ジエンが立体配座を安定化させることを示唆している (Sedraniらの文献 (2003)) 。 コンピュータモデル化研究は、SFAのスピロ環状単位もSFA-CypA結合の安定性に寄与し得ることを示している (Pembertonらの文献 (2003)) 。 完全なSFA-CypA複合体の結晶構造は、SFA-CypAにおける結合領域が、CsA-CypAにおけるものと実質的に同じであり、かつSFAおよびCsAの両方が主として、残基W121、R55、H126、N102、およびQ63と相互作用し ; 大員環とスピロ環状部分の間のC24-C32鎖は、CypAの残基I57、T119、およびW121とファンデルワールス接触をなし ; 加えてSFAの長いポリケチド鎖の存在は、CypAの結晶構造と比較してW121における側鎖の再配向を与え ; スピロ環内で、メチル基C45のみが、CypAのI57およびF60由来の側鎖原子とファンデルワールス接触をなすことを示している (Kallenらの文献 (2005)) 。

30

40

【 0 0 0 7 】

SFA-CypA複合体は、ゲル濾過クロマトグラフィーによって示されるように、安定した二量体形態で存在することができる。結晶分析に基づいて、スピロ二環部分および β -ケト酪酸部分を除き、SFAの残りの部分がすべて、二量体に深く埋め込まれ ; E,E-ジエン領域C18-C22は、CypAとの直接的な接触に関与しないが、代わりに、二量体内で隣接するSFAのメタ-チロシンとのファンデルワールス接触を形成し、このことは、複合体における二量体会合に好都合であり ; 2つのSFA分子は、領域C18-C22において互いにファンデルワール

50

ス接触をなし；かつ直接的な水素結合は、二量体複合体における1個のCypA分子のW121および別のCypA分子のR148を連結する。

【0008】

SFAを産生することが公知であるストレプトミセス菌であるストレプトミセス属A92-308110（ストレプトミセス・フラベオルス）を用いて、本発明の発明者らは、その生合成遺伝子クラスターをクローニングし、微生物学、分子生物学、生化学、および有機化学を組み合わせている方法によって、SFAの生合成をさらに研究した。生合成の研究を通じて、ピペラジン酸などの異なる化学構造を生じる酵素機序が明らかとなった。これに基づいて、遺伝子修飾が、SFA生合成経路に対してなされ、新規の化合物を製造した。

本発明は、組換えDNA技術および生合成工学に関する商業的応用によって、サングリフェリンの収量および新規のサングリフェリン類似体の生成を増大させることができるべきであるように、特に有用である。

【発明の概要】

【0009】

本発明は、生合成遺伝子産物の製造、特にサングリフェリンの生合成に関与する新規のDNA配列およびタンパク質を有利に提供する。該遺伝子およびタンパク質の具体的な実施態様を、添付の配列表および下記の説明において詳述する。配列番号1の配列は、サングリフェリンAの生合成の原因となる核酸を提供する。

【0010】

このように、本発明は、ストレプトミセス属A92-308110（ストレプトミセス・フラベオルス）（DSMZ, Braunschweig, Germanyからストレプトミセス属DSM9954として入手可能）によって産生される免疫抑制性ポリケチド-非リボソームペプチド天然産物であるSFAの生合成遺伝子クラスターのクローニング、配列分析、機能的実証、インビトロでの生化学分析、および使用に関する。加えて、標的となる変化が、サングリフェリンの生成のための生合成経路をコードする遺伝子に対してなされ、新規のサングリフェリン類似体を産生する微生物株をもたらす。

【0011】

本発明によって、サングリフェリンAの生合成に関与する遺伝子およびタンパク質の生合成工学を介したサングリフェリンAおよび関連した化学構造に関する直接的な操作が可能となる。これらの化学的修飾は、構造が複雑であるため化学方法論によって、行うことが不可能であるかまたは実行できないかのいずれかであり得る。

【0012】

この方法で単離されおよび特徴づけられた遺伝子クラスターによって、例えば、遺伝子クラスターもしくは該クラスターの部分の複製によって、プラスミドベクターおよび非天然プロモーターを用いた遺伝子（特に正の調節遺伝子）の過剰発現によって、または負の調節因子の失活によって、サングリフェリンおよびサングリフェリン類似体の製造に関する標的となる最適化が可能となる。加えて、配列決定されおよび特徴づけられたクラスターによって、サングリフェリン類似体に関する標的となる生合成調製が可能となり、このことに関するいくつかの例が本文書に含まれている。例には下記を含む：

・例えば遺伝子破損による個々の生合成工程に関与するタンパク質をコードする遺伝子の失活（例えば、WO2004/007709；WO2004/058976参照）。

・遺伝子置換後にまたは破損後に他の生合成経路に由来する遺伝子を個別に発現させることによる、個々の生合成工程に関与するタンパク質をコードする遺伝子の置換（例えば、Gaisserらの文献（2001）；WO01/79520；WO2005/054266；WO2005/054265参照）

・新規のサングリフェリン類似体（例えば、Oliynykらの文献（1996）；WO 98/01546；WO 00/01827；StauntonおよびWilkinsonの文献（2001）；Sheehanらの文献（2006）に記載されているものなど）の生成を可能にするための、ポリケチドシンターゼ（「PKS」）または非リボソームペプチドシンターゼ（「NRPS」）内の個々のモジュールまたはドメインと、他のPKSクラスターまたはNRPSクラスターに由来するモジュールまたはドメインとの交換

10

20

30

40

50

・例えばDNAプローブとしての使用による、他の生体に由来する関連した生合成クラスターを同定するための遺伝子配列の使用（例えば、Shenらの文献（2002）；Liuらの文献（2002）；Liらの文献（2004）；Huangらの文献（2005）；Jiaらの文献（2006）；Fangらの文献（2008）参照）

【0013】

従って、本発明の第一の態様によると、下記を含む単離された核酸分子が提供される：

（a）配列番号1の配列を含むサングリフェリンA生合成遺伝子クラスター核酸；

（b）（a）の核酸と少なくとも80%の配列同一性（例えば、少なくとも85または90または95または96または97または98または99%の配列同一性）を有し、かつ（a）の核酸によってコードされるものと同じの、ポリケチドまたはポリケチド開始単位を生成するための酵素活性および調節活性を有するポリペプチドをコードする核酸；

（c）（a）の核酸によってコードされる1つ以上のポリペプチドと少なくとも80%のアミノ酸配列同一性（例えば、少なくとも85または90または95または96または97または98または99%の配列同一性）を有する1つ以上のポリペプチドをコードし、かつポリケチドまたはポリケチドの開始単位または前駆体を生成するのに必要な酵素活性または調節活性の1つ以上を有する1つ以上のポリペプチドをコードする核酸；

（d）ポリケチドシンターゼもしくは非リボソームペプチドシンターゼポリペプチドもしくはいずれかの酵素活性モジュール、またはポリケチドの開始単位もしくは前駆体の生合成遺伝子産物、またはポリケチド生合成調節ポリペプチドをコードする（a）、（b）、もしくは（c）の核酸部分；あるいは

（e）ポリケチドシンターゼもしくは非リボソームペプチドシンターゼポリペプチドもしくはいずれかの酵素活性モジュール、またはポリケチドの開始単位もしくは前駆体の生合成遺伝子産物もしくはポリケチド生合成調節ポリペプチドの酵素活性ドメインをコードする（d）の核酸部分。

本発明のこの態様および他の態様は、上記の開示において詳述されるであろう。

【0014】

（定義）

冠詞「1つの（a）」および「1つの（an）」は、冠詞の文法対象の1つ以上（すなわち、少なくとも1つ）を指すために本明細書で用いられる。例によって、「類似体（an analogue）」は、1つの類似体または2つ以上の類似体を意味する。

本明細書で使用する場合、用語「類似体（analogue(s)）」は、互いに構造的に類似だが、（ある原子を別の原子によって置換する上でまたは特定の官能基の存在下もしくはは不在下でなど）組成においてわずかに異なる化合物を指す。

【0015】

本明細書で使用する場合、用語「ポリケチド」は、ポリケチドシンターゼ（PKS）を包含する生合成を介して生成する任意の分子を指す。これには追加的に、非リボソームペプチドシンターゼ（NRPS）ドメイン由来のいくつかのエLEMENT、および/またはメチル化もしくはヒドロキシル化などのさらなる生合成修飾を含んでもよい。

【0016】

本明細書で使用する場合、用語「ハイブリッドポリケチド」は、ポリケチドシンターゼ（PKS）を包含する生合成を介して生成される任意の分子を指し、ここで、このポリケチドシンターゼをコードする遺伝子クラスターは、人間の介入によって変化して異なる生合成産物に至っている。これには追加的に、非リボソームペプチドシンターゼドメイン由来のいくつかのエLEMENTおよび/またはメチル化もしくはヒドロキシル化などのさらなる生合成修飾を含んでもよい。変化自体には、ドメイン（例えば、アシルトランスフェラーゼドメイン）の位置指定突然変異誘発、同一のまたは異種性のPKSクラスターまたはNRPSクラスターに由来するドメイン、モジュール、または遺伝子の置換を含んでもよいが、これらに限定されない。

【0017】

本明細書で使用する場合、用語「高い厳密性の条件」は、非常に密接に関連したまたは

10

20

30

40

50

同一のDNA配列のみがハイブリッド形成する条件を意味する。これは、サザンハイブリダイゼーションにおいて洗浄緩衝液の温度を上昇させることによってしばしばなされる。オリゴヌクレオチドプローブについては、ハイブリダイゼーション工程は、完全に符合する配列についての T_m を上回る5℃で実施することができ、ここで、 T_m は、 $T_m = 4 \times (\text{GC塩基対の数}) + 2 \times (\text{AT塩基対の数})$ などの式を用いて算出される。高い厳密性の条件の一例は、「核酸ハイブリダイゼーション」という表題のついた以下の段落において与えられる。

【0018】

本明細書で使用する場合、核酸配列、特にサングリフェリン生合成クラスターまたはその部分と関連した用語「異種性宿主」は、このような核酸配列を天然に含まないであろう宿主を意味する。

10

本明細書で使用する場合、用語「異種性」は、例えば、サングリフェリンPKSまたはNRPSのドメインまたはモジュールと関連して、該PKSまたはNRPSに天然には存在しないであろうドメインまたはモジュールを意味する。

【0019】

本明細書で使用する場合、用語「非天然」は、例えばサングリフェリンPKSまたはNRPSのドメインまたはモジュールと関連して、該PKSまたはNRPSにおけるその位置に天然には存在しないであろうドメインまたはモジュールを意味し；例えば、該ドメインまたはモジュールは異種性であり得（すなわち、異なるPKSもしくはNRPSに由来）、またはそれに替わるものとして、同一のPKSまたはNRPSにおける異なる位置に存在し得る。

【0020】

20

式(1)の化合物などの本発明の化合物の医薬として許容し得る塩には、医薬として許容し得る無機もしくは有機の酸もしくは塩基から形成される従来の塩、および第四級アンモニウム酸付加塩を含む。適切な酸塩に関するより具体的な例には、塩酸、臭化水素酸、硫酸、リン酸、硝酸、過塩素酸、フマル酸、酢酸、プロピオン酸、コハク酸、グリコール酸、ギ酸、乳酸、マレイン酸、酒石酸、クエン酸、パーム酸 (palmoic)、マロン酸、ヒドロキシマレイン酸、フェニル酢酸、グルタミン酸、安息香酸、サリチル酸、フマル酸、トルエンスルホン酸、メタンスルホン酸、ナフタレン-2-スルホン酸、ベンゼンスルホン酸ヒドロキシナフトエ酸、ヨウ化水素酸、リンゴ酸、ステロン酸 (steroic)、タンニン酸、およびこれらの類似物を含む。塩酸塩は、特に関心対象である。それ自体医薬として許容し得るものではないが、シュウ酸などの他の酸は、本発明の化合物およびそれらの医薬として許容し得る塩を得る上での中間体として有用な塩の調製において有用であり得る。適切な塩基塩に関するより具体的な例には、ナトリウム塩、リチウム塩、カリウム塩、マグネシウム塩、アルミニウム塩、カルシウム塩、亜鉛塩、N,N'-ジベンジルエチレンジアミン塩、クロロプロカイン塩、コリン塩、ジエタノールアミン塩、エチレンジアミン塩、N-メチルグルカミン塩、およびプロカイン塩を含む。本発明に従った化合物に対するその後の引用には、式(1)の化合物およびそれらの医薬として許容し得る塩の両方を含む。

30

アルキル基、アルケニル基、およびアルキニル基は、直鎖または分岐鎖であり得る。

アルキル基、例えば、C1-C4アルキル基の例には、メチル、エチル、n-プロピル、i-プロピル、およびn-ブチルを含む。

40

【0021】

(本発明の詳細な説明)

本発明に従った全遺伝子クラスターは、24個の遺伝子のヌクレオチド配列または相補的配列（配列番号1の配列）を含み、下記を含む：

- ・概して3つのモジュール、10個の機能的ドメインを含み、かつ大環状骨格 (macrocyclic backbone) のペプチド部分の形成の原因となる1つの非リボソームペプチドシンターゼ (NRPS) 遺伝子sfaD；

- ・大環状骨格のスピロ環、ポリケチド長鎖、およびポリケチド部分の形成の原因となる5つの直鎖ポリケチドシンターゼ (PKS) 遺伝子sfaE、sfaF、sfaG、sfaH、sfaI；

- ・通常ではない7炭素伸長単位の生合成の途中で、特殊な6炭素前駆体の生合成の原因と

50

なる、4つの機能ドメインを含む1つの反復性ポリケチドシンターゼ遺伝子sfaK；

・非天然アミノ酸前駆体構築ブロックの生合成の原因となる3つの遺伝子sfaA、sfaB、sfaJ

・開始単位についてのものなど、前駆体の生合成の原因となる7つの遺伝子sfaM、sfaN、sfaP、sfaQ、sfaL、sfaR、sfaO；

・SFAの発酵収量と関連した1つの調節遺伝子sfaC；

・NRPSの調節と関連すると仮定されている1つのMbtHタンパク質コード遺伝子sfaS；

・未知の機能を有する5つの遺伝子sfaU1、sfaU2、sfaV1、sfaV2、sfaV3。

【0022】

従ってまた、本発明は、(a) sfaE、sfaF、sfaG、sfaH、およびsfaIから選択される直鎖PKS遺伝子、または(b) NPRS遺伝子sfaD、または(c) 反復性PKS遺伝子sfaK、または(d) sfaA、sfaB、sfaJ、sfaM、sfaN、sfaP、sfaQ、sfaL、sfaOから選択される開始単位もしくは前駆体の生合成遺伝子、または(e) 調節遺伝子sfaC、または(f) MtbHタンパク質をコードする遺伝子sfaS、または(g) クロトニルCoA還元酵素遺伝子sfaR、または(h) sfaU1、sfaU2、sfaV1、sfaV2、およびsfaV3から選択される未知の機能の遺伝子のうちの1つ以上を含む単離された核酸分子も提供する。

上記の遺伝子は典型的に、配列番号2～25の配列のタンパク質をコードする核酸によって定義される。

【0023】

特に、本発明は、(a) 配列番号1の配列の残基30707～37360であるsfaE、配列番号1の配列の残基37394～50014であるsfaF、配列番号1の配列の残基50017～60903であるsfaG、配列番号1の配列の残基60918～85823であるsfaH、および配列番号1の配列の残基85823～96040であるsfaIから選択される直鎖PKS遺伝子、または(b) 配列番号1の配列の残基19885～30714であるNPRS遺伝子sfaD、または(c) 配列番号1の配列の残基97396～101840である反復性PKS遺伝子sfaK、または(d) 配列番号1の配列の残基17024～17854であるsfaA、配列番号1の配列の残基17851～19191であるsfaB、配列番号1の配列の残基96225～97391であるsfaJ、配列番号1の配列の残基103210～103929であるsfaM、配列番号1の配列の残基104001～105023であるsfaN、配列番号1の配列の残基105366～107216であるsfaP、配列番号1の配列の残基107366～108145であるsfaQ、配列番号1の配列の残基101936～103213であるsfaL、配列番号1の配列の残基105091～105345であるsfaOから選択される開始単位もしくは前駆体の生合成遺伝子、または(e) 配列番号1の配列の残基19193～19888である調節遺伝子sfaC、または(f) 配列番号1の配列の残基109583～109798であるMtbHタンパク質コード遺伝子sfaS、または(g) または配列番号1の配列の残基108150～109511であるクロトニルCoA還元酵素遺伝子sfaR、または(h) 配列番号1の配列の残基14973～15413であるsfaU1、配列番号1の配列の残基15596～16063であるsfaU2、配列番号1の配列の残基109776～110312であるsfaV1、配列番号1の配列の残基111285～111743であるsfaV2、および配列番号1の配列の残基112218～112652であるsfaV3から選択される未知の機能の遺伝子のうちの1つ以上を含む；上記の遺伝子によってコードされるものと同一のポリペプチドの1つ以上をコードするが、遺伝暗号の重複性によってのみ異なる核酸配列を含む；あるいは、高い厳密性の条件下で先の遺伝子配列の1つ以上とハイブリッド形成することのできる核酸配列を含む；あるいは先の遺伝子配列の1つ以上と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%の同一性を有し、かつ対応する遺伝子産物と同一の機能を有するポリペプチドをコードする核酸配列を含む；あるいは上記の遺伝子によってコードされるポリペプチドの1つ以上と少なくとも80%のアミノ酸配列同一性（例えば、少なくとも85または90または95または96または97または98または99%の配列同一性）を有する1つ以上のポリペプチドをコードし、かつ同一の機能を有する核酸配列を含む単離された核酸分子；あるいは、上記の遺伝子の1つ以上の少なくとも50、100、200、または500個の連続したヌクレオチドを含む断片；あるいは、上記の核酸配列のいずれかの相補体を提供する。

【0024】

また、(a) 配列番号1の配列の残基30707～37360であるsfaE、配列番号1の配列の残基37394～50014であるsfaF、配列番号1の配列の残基50017～60903であるsfaG、配列番号1の残基60918～85823であるsfaH、もしくは配列番号1の配列の残基85823～96040であるsfaIから選択されるPKS遺伝子に由来するモジュールもしくはドメイン、または(b) 配列番号1の配列の残基19885～30714であるNRPS遺伝子sfaDに由来するモジュールもしくはドメイン、または(c) 配列番号1の配列の残基97396～101840である反復性PKS遺伝子sfaKに由来するドメインのうちの1つ以上を含む；または上記の遺伝子によってコードされるものと同一のポリペプチドの1つ以上のモジュールもしくはドメインをコードするが、遺伝暗号の重複性によってのみ異なる核酸配列を含む；または高い塩密度の条件下で先の核酸分子の1つ以上とハイブリッド形成することのできる核酸配列を含む；または先の核酸分子の1つ以上と少なくとも70%の同一性を有し、かつ対応する遺伝子産物のモジュールもしくはドメインと同一の機能を有するポリペプチドをコードする核酸配列を含む；または上記の遺伝子のモジュールもしくはドメインによってコードされるポリペプチドの1つ以上と少なくとも80%のアミノ酸配列同一性を有しかつ同一の機能を有する1つ以上のポリペプチドをコードする核酸配列を含む単離された核酸分子；あるいは、上記の遺伝子のモジュールもしくはドメインの1つ以上の少なくとも50個の連続したヌクレオチドを含む断片；あるいは上記の核酸配列のいずれかの相補体も提供される。

遺伝子のモジュールまたはドメインは、対応する遺伝子産物のモジュールまたはドメインをコードする遺伝子の部分である。

【0025】

また、1つ以上（例えば1つ）のドメイン、モジュール、もしくは遺伝子が欠失され、酵素機能もしくは調節機能を失活させるもしくはより低くさせるよう突然変異し、変化した機能性を有するよう突然変異し、または置換によって置換された、あるいは、1つ以上（例えば、1つ）の非天然のドメイン、モジュール、もしくは遺伝子が挿入された（ここで、1つ以上（例えば1つ）のドメイン、モジュール、もしくは遺伝子は、(a) サングリフェリンA生合成遺伝子クラスターにおける別の箇所のドメイン、モジュール、もしくは遺伝子、または(b) サングリフェリンA生合成遺伝子クラスターに対して異種性であるドメイン、モジュール、もしくは遺伝子によって置換されており、あるいはここで、1つ以上（例えば1つ）のドメイン、モジュール、もしくは遺伝子が、酵素機能もしくは調節機能を失活させるもしくはより低くさせるよう突然変異している。）、配列番号1の配列に基づいたハイブリッドポリケチド生成遺伝子クラスター核酸も提供される。

【0026】

例えば、sfaE、F、G、H、およびIから選択される1つ以上のPKS遺伝子が修飾され、これにより1つ以上のドメインもしくはモジュールが、欠失され、酵素機能を失活させるもしくはより低くさせるように、または変化した機能性を有するよう突然変異し、あるいは、置換によって置換され、あるいはこれにより1つ以上の非天然のドメインもしくはモジュールが挿入され、例えば、SFA生合成遺伝子クラスターにおける別の箇所の、又は異種ポリケチド遺伝子クラスターの1つ以上のドメインもしくはモジュールが挿入された、ハイブリッドポリケチド生成遺伝子クラスター核酸が提供される。

PKS遺伝子sfaE、F、G、H、およびIのモジュールは、図7に対する引用によりわかるかもしれない。このように、モジュールは典型的には、KS-AT-ACPドメインまたはKS-AT-DH-KR-ACPドメインまたはKS-AT-KR-ACPドメインまたはKS-AT-DH-ER-KR-ACPドメインを含んでもよい。

【0027】

例えば：

- ATドメインは、異種性のPKSに由来するもしくは異なる基質特異性を有するSFA PKS内のほかのどこかに由来するATドメインと置換されてもよく；および/または

- DHドメインは欠失されもしくは失活してもよく；および/または

- SFA PKS由来のもしくは異種性のPKS由来のDHドメインはモジュールに挿入されてもよく；

10

20

30

40

50

- ERドメインは欠失されもしくは失活してもよく；および／または
- SFA PKS由来のもしくは異種性のPKS由来のERドメインはモジュールに挿入されてもよい。

- 所定のモジュール（存在する場合、DH-KRドメインまたはDH-ER-KRドメインまたはKRドメインを意味する。）の還元型ループは、異なる要素を有する還元型ループによって置換されてもよい。

【0028】

一実施態様において、モジュール13のATドメインは、SFA PKS由来のまたは異なる基質特異性を有する（例えば、メチルマロニルに対して特異性を有する）異種性PKS由来のATドメインと置換されてもよい。この特定の突然変異は、位置14におけるメチル基の導入を

10

もたらす。
一実施態様において、モジュール1、3、6、7、8、10、11、および13のうちの1つ以上のDHドメインは、欠失されまたは失活する。これらの特定の突然変異は、例えば位置21および／または25における1つ以上のヒドロキシル基のモジュールへの導入をもたらす。

【0029】

また、NRPS遺伝子sfaDが修飾され、これにより1つ以上のドメインもしくはモジュールが、欠失され、酵素機能を失活させるもしくはより低くさせるようにまたは変化した機能性を有するように突然変異し、または置換によって置換され、あるいはこれにより1つ以上の非天然のドメインもしくはモジュールが挿入されたハイブリッドポリケチド生成遺伝子クラスター核酸も提供される。

20

また、調節遺伝子sfaCが、その活性を増大もしくは低下させるよう修飾された、または欠失されたハイブリッドポリケチド生成遺伝子クラスター核酸も提供される。

【0030】

また、反復性PKS遺伝子sfaKが修飾され、これにより1つ以上のドメインが、欠失され、酵素機能を失活させもしくはより低くさせ、または変化した機能性を有するよう突然変異し、または置換によって置換され、あるいはこれにより1つ以上の非天然ドメインが挿入された、例えば、これによりSFA生合成遺伝子クラスターにおけるほかのどこか由来のもしくは異種性のポリケチド生合成クラスター由来の1つ以上のドメインが挿入されたハイブリッドポリケチド生成遺伝子クラスター核酸も提供される。

反復性PKS遺伝子sfaKのモジュールは、図7に対する引用によりわかるかもしれない。このように、該モジュールは、KS-AT-ACP-KRドメインを含む。

30

【0031】

また、sfaA、B、J、M、N、P、Q、L、およびOから選択される1つ以上の開始単位もしくは前駆体生合成遺伝子が、欠失され、またはその活性を低下させるよう修飾され、またはその基質選択性を変化させるよう修飾されもしくは置換されたハイブリッドポリケチド生成遺伝子クラスター核酸も提供される。

【0032】

また、1つ以上の開始単位、または前駆体生合成遺伝子、または1つ以上の開始単位もしくは前駆体生合成遺伝子を含む1つ以上のオペロンが、欠失され、あるいは天然の遺伝子もしくはオペロンと比べて、該開始単位もしくは前駆体を生成することにおいて失活するようにまたは活性を低下させるように突然変異したハイブリッドポリケチド生成遺伝子クラスター核酸も提供される。

40

【0033】

本発明のこの態様に関するより好ましい実施態様には、配列番号1の配列の残基19885～30714、30707～37360、37394～50014、50017～60903、60918～85823、85823～96040のPKSまたはNRPSのドメインをコードする単離された核酸を含む。これらの核酸は、単独でまたは他のPKSもしくはNRPSのドメインもしくは媒介物としてのモジュールをコードする核酸との組み合わせで、例えば、組換えベクターの構築物において用いることができる。

【0034】

また、本発明は、先に説明されたDNA断片のうちの任意の1つを含む核酸を同定し、単離

50

し、およびクローニングする方法も提供する。好ましい方法は、例えば下記の工程を含む：

- a) ゲノムDNAバンク（例えば、コスミドライブラリー）を設定すること
- b) 本発明のDNA配列の助力によってこのバンクをスクリーニングすること
- c) 陽性であると同定されたクローンを単離すること

サングリフェリンの生合成に關与するDNA断片を同定する一般的な方法は例えば、下記の工程を含む：

a. サングリフェリン遺伝子クラスターに対して相同性を有するDNA断片を単離することは、配列番号1の配列由来のDNA断片（例えば最大1kb）を用いて探索し、サングリフェリンクラスターに対して相同性を有するクローン化断片を見出す、コスミドライブラリーを
10

サザンブロッティングすることによって実施できる。

b. 次に、プローブとハイブリッド形成するとみられるコスミドを除去でき、DNA配列決定することができる。

c. 次に、先に単離した標識したコスミドを用いて、重複するDNAを含むコスミドに対してコスミドライブラリーを探索することによって、隣接するDNA領域を単離することができる。

【0035】

本発明はさらに、未知の機能のタンパク質をコードするヌクレオチド配列を提供する。それがコードするアミノ酸配列は、配列番号2の配列に示されるとおりであり、sfaU1と命名され、対応するヌクレオチド配列は、配列番号1の配列に示されるとおりであり、塩基位置14973から開始し、塩基位置15413に至る。

【0036】

本発明はさらに、未知の機能の別のタンパク質をコードするヌクレオチド配列を提供する。それがコードするアミノ酸配列は、配列番号3の配列に示されるとおりであり、SfaU2と命名され、対応するヌクレオチド配列は、配列番号1の配列に示されるとおりであり、塩基位置15596から開始し、塩基位置16063に至る。

【0037】

本発明はさらに、フェニルアラニンメタ-ヒドロキシラーゼをコードするヌクレオチド配列を提供する。それがコードするアミノ酸配列は、配列番号4の配列に示されるとおりであり、sfaAと命名され、対応するヌクレオチド配列は、配列番号1の配列に示されるとおりであり、塩基位置17024から開始し、塩基位置17854に至る。

【0038】

本発明はさらに、オルニチンN5-オキシゲナーゼをコードするヌクレオチド配列を提供する。それがコードするアミノ酸配列は、配列番号5の配列に示されるとおりであり、sfaBと命名され、対応するヌクレオチド配列は、配列番号1の配列に示されるとおりであり、塩基位置17851から開始し、塩基位置19191に至る。

【0039】

本発明はさらに、転写調節因子をコードするヌクレオチド配列を提供する。それがコードするアミノ酸配列は、配列番号6の配列に示されるとおりであり、sfaCと命名され、対応するヌクレオチド配列は、配列番号1の配列に示されるとおりであり、塩基位置19193から開始し、塩基位置19888に至る。

【0040】

本発明はさらに、機能ドメインC、A、PCP、C、A、PCP、C、A、PCP、Cを含み、かつ大環状骨格のペプチド部分の生合成を生じる非リボソームペプチドシンターゼをコードするヌクレオチド配列を提供する。それがコードするアミノ酸配列は、配列番号7の配列に示されるとおりであり、sfaDと命名され、対応するヌクレオチド配列は、配列番号1の配列に示されるとおりであり、塩基位置19885から開始し、塩基位置30714に至る。

【0041】

10

20

30

40

50

本発明はさらに、機能ドメインACP、KS、AT、DH、ER、KR、ACPを含みかつスピロ環状部分の前駆体の生合成を生じるポリケチドシンターゼをコードするヌクレオチド配列を提供する。それがコードするアミノ酸配列は、配列番号8の配列に示されるとおりであり、sfaEと命名され、対応するヌクレオチド配列は、配列番号1の配列に示されるとおりであり、塩基位置30707から開始し、塩基位置37360に至る。

【0042】

本発明はさらに、2-エチルマロナミル-S-チオエステル基質を用いてPKS生合成を開始するのに特異的な負荷ドメインを提供し、sfaE由来の第一のACPからなり、対応するヌクレオチド配列は、配列番号1の配列に示されるとおりであり、塩基位置30707から開始し、塩基位置31082に至る。

10

【0043】

本発明はさらに、機能ドメインKS、AT、ACP、KS、AT、KR、ACP、KS、AT、KR、ACPを含み、かつポリケチド長鎖の生合成を生じるポリケチドシンターゼをコードするヌクレオチド配列を提供する。それがコードするアミノ酸配列は、配列番号9の配列に示されるとおりであり、sfaFと命名され、対応するヌクレオチド配列は、配列番号1の配列に示されるとおりであり、塩基位置37394から開始し、塩基位置50014に至る。

【0044】

本発明はさらに、機能ドメインKS、AT、KR、ACP、KS、AT、DH、ER、KR、ACPを含み、かつポリケチド長鎖の多くに関する生合成を生じるポリケチドシンターゼをコードするヌクレオチド配列を提供する。それがコードするアミノ酸配列は、配列番号10の配列に示されるとおりであり、sfaGと命名され、対応するヌクレオチド配列は、配列番号1の配列に示されるとおりであり、塩基位置50017から開始し、塩基位置60903に至る。

20

【0045】

本発明はさらに、機能ドメインKS、AT、DH、KR、ACP、KS、AT、DH、KR、ACP、KS、AT、KR、ACP、KS、AT、DH、KR、ACPを含み、かつ大環状骨格のポリケチド部分の一部の生合成を生じるポリケチドシンターゼをコードするヌクレオチド配列を提供する。それがコードするアミノ酸配列は、配列番号11の配列に示されるとおりであり、sfaHと命名され、対応するヌクレオチド配列は、配列番号1の配列に示されるとおりであり、塩基位置60918から開始し、塩基位置85823に至る。

【0046】

30

本発明はさらに、機能ドメインKS、AT、KR、ACP、KS、AT、KR、ACPを含み、かつ大環状骨格のポリケチド部分の一部の生合成を生じるポリケチドシンターゼをコードするヌクレオチド配列を提供する。それがコードするアミノ酸配列は、配列番号12の配列に示されるとおりであり、sfaIと命名され、対応するヌクレオチド配列は、配列番号1の配列に示されるとおりであり、塩基位置85823から開始し、塩基位置96040に至る。

【0047】

本発明はさらに、ジンクフィンガー脱水素酵素をコードするヌクレオチド配列を提供する。それがコードするアミノ酸配列は、配列番号13の配列に示されるとおりであり、sfaJと命名され、対応するヌクレオチド配列は、配列番号1の配列に示されるとおりであり、塩基位置96225から開始し、塩基位置97391に至る。

40

【0048】

本発明はさらに、機能ドメインKS、AT、ACP、KRを含む反復性ポリケチドシンターゼをコードするヌクレオチド配列を提供する。それがコードするアミノ酸配列は、配列番号14の配列に示されるとおりであり、sfaKと命名され、対応するヌクレオチド配列は、配列番号1の配列に示されるとおりであり、塩基位置97396から開始し、塩基位置101943に至る。

【0049】

本発明はさらに、アシルトランスフェラーゼをコードするヌクレオチド配列を提供する。それがコードするアミノ酸配列は、配列番号15の配列に示されるとおりであり、sfaLと命名され、対応するヌクレオチド配列は、配列番号1の配列に示されるとおりであり、塩基位置101936から開始し、塩基位置103213に至る。

50

【 0 0 5 0 】

本発明はさらに、短鎖脱水素酵素 / 還元酵素をコードするヌクレオチド配列を提供する。それがコードするアミノ酸配列は、配列番号16の配列に示されるとおりであり、sfaMと命名され、対応するヌクレオチド配列は、配列番号1の配列に示されるとおりであり、塩基位置103210から開始し、塩基位置103929に至る。

【 0 0 5 1 】

本発明はさらに、アシルケト酸シンターゼをコードするヌクレオチド配列を提供する。それがコードするアミノ酸配列は、配列番号17の配列に示されるとおりであり、sfaNと命名され、対応するヌクレオチド配列は、配列番号1の配列に示されるとおりであり、塩基位置104001から開始し、塩基位置105023に至る。

10

【 0 0 5 2 】

本発明はさらに、遊離アシルキャリアタンパク質をコードするヌクレオチド配列を提供する。それがコードするアミノ酸配列は、配列番号18の配列に示されるとおりであり、sfaOと命名され、対応するヌクレオチド配列は、配列番号1の配列に示されるとおりであり、塩基位置105091から開始し、塩基位置105345に至る。

【 0 0 5 3 】

本発明はさらに、アスパラギンシンターゼ類似体をコードするヌクレオチド配列を提供する。それがコードするアミノ酸配列は、配列番号19の配列に示されるとおりであり、sfaPと命名され、対応するヌクレオチド配列は、配列番号1の配列に示されるとおりであり、塩基位置105366から開始し、塩基位置107216に至る。

20

【 0 0 5 4 】

本発明はさらに、遊離チオエステラーゼをコードするヌクレオチド配列を提供する。それがコードするアミノ酸配列は、配列番号20の配列に示されるとおりであり、sfaQと命名され、対応するヌクレオチド配列は、配列番号1の配列に示されるとおりであり、塩基位置107366から開始し、塩基位置108145に至る。

【 0 0 5 5 】

本発明はさらに、クロトニルCoA還元酵素をコードするヌクレオチド配列を提供する。それがコードするアミノ酸配列は、配列番号21の配列に示されるとおりであり、sfaRと命名され、対応するヌクレオチド配列は、配列番号1の配列に示されるとおりであり、塩基位置108150から開始し、塩基位置109511に至る。

30

【 0 0 5 6 】

本発明はさらに、MbtH-ファミリータンパク質をコードするヌクレオチド配列を提供し、それがコードするアミノ酸配列は、配列番号22の配列に示されるとおりであり、sfaSと命名され、対応するヌクレオチド配列は、配列番号1の配列に示されるとおりであり、塩基位置109583から開始し、塩基位置109798に至る。

【 0 0 5 7 】

本発明はさらに、未知の機能のタンパク質をコードするヌクレオチド配列を提供する。それがコードするアミノ酸配列は、配列番号23の配列に示されており、sfaV1と命名され、対応するヌクレオチド配列は、配列番号1の配列に示されるとおりであり、塩基位置109776から開始し、塩基位置110312に至る。

40

【 0 0 5 8 】

本発明はさらに、未知の機能の別のタンパク質をコードするヌクレオチド配列を提供する。それがコードするアミノ酸配列は、配列番号24の配列に示されるとおりであり、sfaV2と命名され、対応するヌクレオチド配列は、配列番号1の配列に示されるとおりであり、塩基位置111285から開始し、塩基位置111743に至る。

【 0 0 5 9 】

本発明はさらに、未知の機能の別のタンパク質をコードするヌクレオチド配列を提供する。それがコードするアミノ酸配列は、配列番号25の配列に示されるとおりであり、sfaV3と命名され、対応するヌクレオチド配列は、配列番号1の配列に示されるとおりであり、塩基位置112218から開始し、位置112652に至る。

50

【 0 0 6 0 】

配列番号1の配列の相補的配列は、DNA塩基相補性の原理に従って得られ得る。配列番号1の配列のヌクレオチド配列またはヌクレオチド配列の部分は、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）によって、または対応するDNAの適切な制限酵素消化によって、または他の適切な技術によって得られ得る。本発明はさらに、配列番号1の配列におけるDNA配列の少なくとも一部を含む組換えDNAプラスミドを得る方法を提供する。

【 0 0 6 1 】

本発明はさらに、断続性のSFA生合成遺伝子を含む微生物を得る方法を提供し、ここで、遺伝子の少なくとも1つは、配列番号1の配列に示されるヌクレオチド配列を含む。

本発明に従ったヌクレオチド配列もしくはヌクレオチド配列の部分は、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）に基づいて得られ得、またはSFA生合成遺伝子に類似した遺伝子は、本発明に従った配列を含むDNA断片をプローブとして用いるサザンハイブリダイゼーション法または類似の方法によって他の生体から得ることができる。

【 0 0 6 2 】

本発明に従ったヌクレオチド配列またはヌクレオチド配列の少なくとも一部を含むクローンDNAを用いて、ストレプトミセス属A92-308110（ストレプトミセス・フラベオルス）のゲノムライブラリーからより多くのライブラリープラスミドを同定してもよい。これらのライブラリープラスミドは、本発明に従った配列の少なくとも一部を含み、かつストレプトミセス属A92-308110（ストレプトミセス・フラベオルス）（ストレプトミセス・フラベオルス）ゲノムにおける隣接した領域から非クローンDNAも同様に含む。

このように、例えば、本発明の任意の態様に従った核酸またはヌクレオチド配列はDNAである。

【 0 0 6 3 】

本発明に従ったヌクレオチド配列またはヌクレオチド配列の少なくとも一部は、修飾されまたは突然変異していてもよい。これらの方法には、挿入、置換もしくは欠失、ポリメラーゼ連鎖反応、誤りがちのポリメラーゼ連鎖反応、位置指定突然変異誘発、異なる配列の再連結反応、配列の異なる部分を用いたもしくは他の源に由来する相同な配列を用いたDNAシャフリング、または紫外線もしくは化学剤などによる突然変異誘発を含む。

【 0 0 6 4 】

また、本発明は、先の核酸を含むDNA発現ベクターなどの組換えベクターも提供する。ベクターは典型的には、1つ以上のプロモーターまたは他の調節エレメントとともに上記のDNAを含む。本発明のこれらのベクターおよび方法によって、当業者は、ポリケチドを産生する能力を有する組換え宿主細胞を作出することができる。このように、本発明は、サングリフェリンAまたはサングリフェリンA類似体などのポリケチドを調製する方法を提供し、該方法は、形質転換された宿主細胞を培養することを含み、該宿主細胞は、配列番号1の配列に記載されたサングリフェリン遺伝子クラスターの全部または部分をコードする核酸を含む発現ベクターを用いて形質転換されている。また、上記の方法によって製造可能でありかつサングリフェリンAではないポリケチドも、本発明の態様として提供される。望ましくは、ベクターは、適切な培地において培養した場合にサングリフェリンAまたはサングリフェリンA類似体を生成することのできる機能的PKSをコードする核酸を含む。いくつかの実施態様において、形質転換された宿主細胞は、サングリフェリンAを天然に産生する。いくつかの実施態様において、形質転換された宿主細胞は、サングリフェリンAを天然に産生しない。また、このような形質転換された宿主細胞も、本発明の態様として提供される。具体的な実施態様は、宿主細胞がサングリフェリンAを天然に産生しないサングリフェリンA生合成遺伝子クラスターの全部または部分をコードする核酸（例えば、該核酸は、配列番号1の配列の核酸によって例示されるサングリフェリンA生合成遺伝子クラスターをコードする。）を含むベクターを用いて形質転換された宿主細胞である。

【 0 0 6 5 】

このようにまた、下記も提供される：

- 上記の任意の核酸によってコードされる1つのポリペプチドまたは複数のポリペプチ

ド；

- 1つ以上のポリケチド生合成タンパク質をコードする上記の核酸によってコードされるポリケチドシンターゼ；および

少なくとも1つのドメインまたはモジュールまたは遺伝子が、サングリフェリンA生合成遺伝子クラスターに対して天然ではないモジュール核酸または遺伝子クラスターによってコードされるハイブリッドタンパク質。

【0066】

別の実施態様において、本発明は、配列番号2～25の配列からなる群から選択される配列を含む単離されたポリペプチド；配列番号2～25のポリペプチドの少なくとも10、50、100、200、または500個の連続したアミノ酸からなる単離されたポリペプチド；およびデフォルトパラメータを用いたBLASTP (Altschulらの文献(1990))によって決定される先の配列と少なくとも50%、60%、80%、85%、90%、95%、97%、または99%の相同性を有する単離されたポリペプチドを提供する。

10

【0067】

また、本発明は、ハイブリッドポリケチドを調製する方法も提供し、該方法は、少なくとも1つのドメインまたはモジュールまたは遺伝子がサングリフェリンA遺伝子クラスターに対して天然ではない配列番号1の配列に記載されたサングリフェリン遺伝子クラスターの全部または部分をコードする核酸を含む組換えベクターを用いて、宿主細胞を形質転換すること、次に、形質転換された宿主細胞を培養することを含む。

本発明は、サングリフェリンAではない上記のプロセスによって製造可能なポリケチドを提供する。

20

【0068】

本発明に従ったヌクレオチド配列またはヌクレオチド配列の少なくとも一部を含むクローン遺伝子は、適切な発現系によって異種性の宿主において発現して、対応するまたはより高い酵素のまたは他の生物学的な活性または収量を得てもよい。これらの異種性の宿主には、ストレプトミセス属、シュードモナス属、大腸菌属、バチルス属、酵母、植物、および動物などを含む。

【0069】

ポリケチド遺伝子クラスターが異種性の宿主において発現し得ることは当業者に公知である(Pfeiferらの文献(2001))。従って、本発明には、異種性の宿主における相補性のために完全な、遺伝子操作された、突然変異を含む、又は欠失を含む、抵抗遺伝子および調節遺伝子をとともなうまたはともなわないサングリフェリン生合成遺伝子クラスターの転移を含む。このような大きなピースのDNAに関する先に定義したような転移についての方法およびベクターは、当技術分野において周知であり(Rawlinsの文献(2001)；StantonおよびWeissmanの文献(2001))、または本明細書に開示された方法において提供される。

30

【0070】

この文脈において、好ましい異種性の宿主細胞株は、原核細胞、より好ましくは、放線菌または大腸菌であり、なおもより好ましくは、ストレプトミセス・ハイグロスコピカス、ストレプトミセス・ハイグロスコピカス種、ストレプトミセス・ハイグロスコピカス変種、ストレプトミセス・ツクバエンシス(tukubaensis)、ストレプトミセス・コエリカラー、ストレプトミセス・リビダンス(lividans)、サッカロポリスボラ・エリスラエア、ストレプトミセス・フラディアエ、ストレプトミセス・アベルミティリス、ストレプトマイセス・シンナモネンシス、ストレプトミセス・リモーサス、ストレプトミセス・アルプス、ストレプトミセス・グリセオフュスカス、ストレプトミセス・ロンギスポロフラバス、ストレプトミセス・ベネズエラエ、ミクロモノスポラ・グリセオルビダ(griseorubida)、アミコラトプシス・メディテラネイ、またはアクチノプラネス種N902-109を含むがこれらに限定されない。

40

【0071】

このように、さらなる態様において、本発明は、サングリフェリン生合成をコードする

50

遺伝子の1つ以上が失活または欠失された新規の株を提供する。

さらなる態様において、本発明は、PKS遺伝子sfaE、sfaF、sfaG、sfaH、またはsfaIの1つ以上のモジュールまたはドメインが、非天然の例えば異種性のドメインまたはモジュールによって失活し、欠失され、または置換された新規の株を提供する。これらの株は、新規のサングリフェリンを産生し得る。特に、SFA産生株に基づいた遺伝子操作された株が提供され、ここで、sfaE、F、G、H、およびIから選択される1つ以上のPKS遺伝子が修飾され、これにより1つ以上のドメインまたはモジュールが欠失され、酵素機能を失活させるもしくはより低くさせるようにまたは変化した機能性を有するように突然変異し、あるいは置換によって置換され、あるいはこれにより1つ以上の非天然のドメインもしくはモジュールが挿入され、例えば、これによりSFA生合成遺伝子クラスターにおけるほかのどこかに由来するまたは異種性のポリケチド生合成クラスターに由来する1つ以上の非天然のドメインまたはモジュールが挿入されている。

10

【0072】

さらなる態様において、本発明は、NRPS遺伝子sfaDの1つ以上のモジュールまたはドメインが、非天然、例えば、異種性のドメインまたはモジュールによって失活し、欠失され、または置換された新規の株を提供する。これらの株は、新規のサングリフェリンを産生し得る。特にNRPS遺伝子sfaDが修飾され、これにより1つ以上のドメインもしくはモジュールが欠失され、酵素機能を失活させるもしくはより低くさせるようにまたは変化した機能性を有するように突然変異し、あるいは置換によって置換され、あるいはこれにより1つ以上の非天然のドメインもしくはモジュールが挿入された、SFA産生株に基づいた遺伝子操作された株が提供される。

20

【0073】

本発明のさらなる態様には下記を含む：

- 調節遺伝子sfaCが、その活性を増大もしくは低下させるよう修飾され、または欠失され、あるいはそれに関連した、sfaCの発現を制御する（プロモーターなどの）調節エレメントが修飾され、置換され、または欠失された、SFA産生株に基づいた遺伝子操作された株。例えば、調節遺伝子sfaCまたはその制御が、その活性または発現レベルを増大させるよう修飾された株は、より高い収量でSFA（またはSFA類似体）を産生し得る。例えば、sfaCは、例えばベクター（Kieserらの文献（1999）において記載されたものなど）におけるsfaC（permEなど）を過剰発現するためのプロモーターを、任意で選択可能なマーカー（アブラマイシンなど）とともに用いることによって、該株において過剰発現し得る。

30

- 1つ以上の異種性のプロモーターの制御下でSFA生合成遺伝子クラスターを含む天然にSFAを産生しない株（すなわち、異種性の宿主）である遺伝子操作された株。強力なプロモーターの使用によって、このような株を用いて、株を培養することおよび任意でSFAを単離することを包含するプロセスによってSFAを高い収量で製造してもよい。

- sfaCを過剰発現させることを包含するより高いレベルのサングリフェリンを製造する方法。

- sfaA、B、J、M、N、P、Q、L、およびOから選択される1つ以上の開始単位または前駆体生合成遺伝子が、欠失され、またはその活性を低下させるよう修飾され、またはその基質特異性を変化させるよう修飾もしくは置換された、SFA産生株に基づいた遺伝子操作された株。

40

【0074】

SFA産生株に基づいた上記の遺伝子操作された株は、適宜培養される場合、SFAまたはSFA類似体を産生し得る。遺伝子操作された株は、先の修飾の任意のおよびすべての組み合わせを有してもよく、追加的な遺伝子修飾を有してもよい。

本発明に従ったアミノ酸配列を用いて、所望のタンパク質を単離してもよく、該アミノ酸配列を抗体の調製のために用いてもよい。

【0075】

欠失されまたは置換されたあるアミノ酸とともに、本発明に従ったアミノ酸配列または該配列の少なくとも一部を含むポリペプチドは、なおも生物活性を有してもよく、または

50

高い収量もしくは最適化されたタンパク質動態またはその他などの新たな生物活性または所望の特性さえ有してもよい。

【0076】

本発明に従ったヌクレオチド配列またはヌクレオチド配列の少なくとも一部を含む遺伝子または遺伝子クラスターは、異種性の宿主において発現し得、宿主の代謝鎖における該遺伝子または遺伝子クラスターの機能は、DNAチップ技術によって研究され得る。

組換えプラスミドは、本発明に従ったヌクレオチド配列またはヌクレオチド配列の少なくとも一部を含む遺伝子または遺伝子クラスターから遺伝子組換えによって構築して、生合成経路を確立することができ、または、挿入、置換、欠失、もしくは失活の方法を用いて、生合成経路を確立することができる。

10

【0077】

本発明に従ったヌクレオチド配列またはヌクレオチド配列の少なくとも一部を含むクローン遺伝子またはDNA断片を用いて、SFA生合成の1つのまたは数個の工程を中断することによって、SFAの新たな構造的類似体を生成してもよい。該DNA断片または遺伝子を用いて、SFAまたはその誘導体の収量を増大させてもよく、本発明は、遺伝子組換えした微生物における収量を増大させる方法を提供する。これに関する例には、負の調節因子の失活または欠失を含む。

【0078】

本発明に従った非リボソームペプチドシンターゼを用いて、同一または異別の非リボソームペプチドシンターゼ系由来の非リボソームポリペプチドシンターゼの1つ以上のドメイン、モジュール、または遺伝子の欠失、挿入、変化、または失活によって新たなペプチド化合物を生成してもよい。

20

【0079】

本発明に従ったポリケチドシンターゼを用いて、同一または異別のポリケチドシンターゼ系由来のポリケチドシンターゼの1つ以上のドメイン、モジュール、または遺伝子の欠失、挿入、変化、または失活によって、新たなポリケチドまたはハイブリッドポリケチドを生成してもよい。

【0080】

本発明に従ったヌクレオチド配列またはヌクレオチド配列の少なくとも一部を含む断片または遺伝子を用いて、非リボソームペプチドシンターゼのライブラリー、非リボソームポリペプチドシンターゼの誘導体のライブラリー、または組み合わせライブラリーを構築してもよい。

30

本発明に従ったヌクレオチド配列をまたはヌクレオチド配列の少なくとも一部を含む断片または遺伝子を用いて、ポリケチドシンターゼのライブラリー、またはポリケチドシンターゼの誘導体のライブラリー、または組み合わせライブラリーを構築してもよい。

【0081】

一言でいえば、本明細書で提供されるSFA生合成と関連した遺伝子およびタンパク質の情報はすべて、SFA天然産物の生合成機序に関する理解を容易にすることができ、さらなる遺伝子工学についての材料および知識を提供する。本明細書で提供される遺伝子およびそれらのタンパク質を用いて、医療、製造業、または農業において用いることのできる化合物、遺伝子、またはタンパク質を探索および発見してもよい。

40

【0082】

加えて、本発明において、生合成経路を理解し、本明細書における本発明を例示し、および免疫抑制活性の機序に関する情報取得のための分子を生成する元来の意図で、サングリフェリン生合成遺伝子クラスターに対して具体的な変更がなされている。

一般に、配列同一性の百分率は、デフォルトパラメータを用いるBLASTN(核酸)またはBLASTP(タンパク質)(Altschulらの文献(1990))によって決定してもよい。

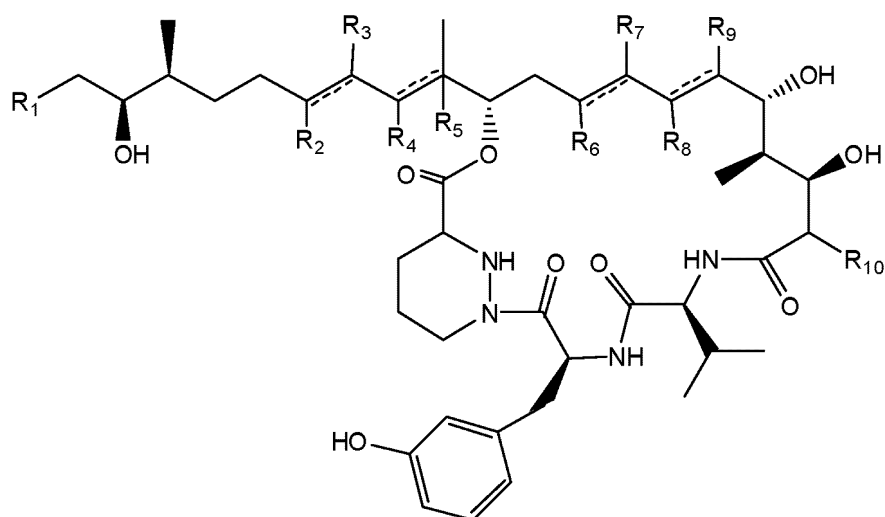
【0083】

従って、本発明の一態様において、式(I)または(II)のサングリフェリン類似体化合物またはその医薬として許容し得る塩が提供され：

50

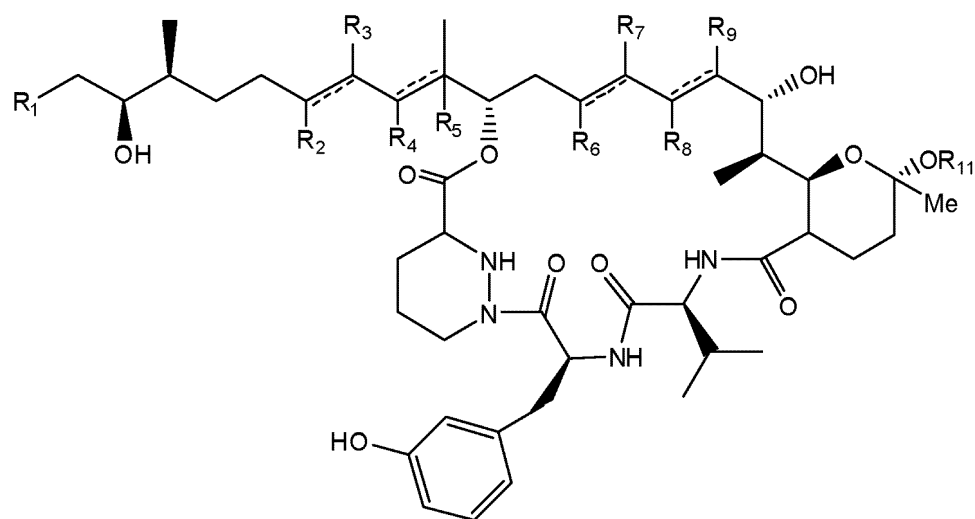
【化 1】

式(I)



10

式(II)



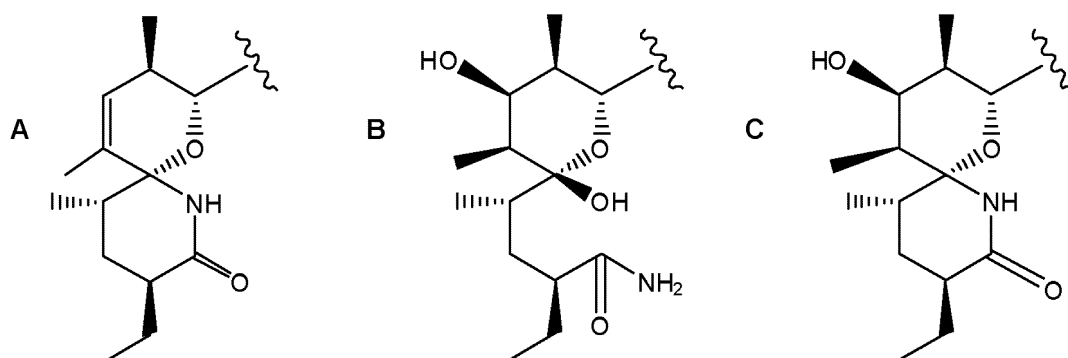
20

30

式中：

R₁は、部分A、B、またはCのうちの1つを表し：

【化 2】



40

R₂はOHを表しかつR₃はHを表し、またはR₂およびR₃は単結合を表し；

50

R_4 はOHを表しかつ R_5 はHを表し、または R_4 および R_5 は単結合を表し；

R_6 はOHを表しかつ R_7 はHを表し、または R_6 および R_7 は単結合を表し；

R_8 はOHを表しかつ R_9 はHを表し、または R_8 および R_9 は単結合を表し；

R_{10} は、Meまたは $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$ を表し；

R_{11} は、HまたはMeを表し；

但し、 R_{10} が $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$ を表す場合、 R_2 および R_4 の両方がOHを表すことができず、ならびに/または R_6 および R_8 の両方がOHを表すことができないことを条件とし、

かつ R_{10} が $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$ を表す場合、 R_2 および R_4 、ならびに R_6 および R_8 が、単結合をすべて表すことができないことを条件とする。

【0084】

一実施態様において、 R_2 は、OHを表し、 R_3 はHを表し、かつ R_4 および R_5 、 R_6 および R_7 、ならびに R_8 および R_9 は単結合を表し、かつ R_{10} は $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$ を表す。

一実施態様において、 R_5 はOHを表し、 R_6 はHを表し、かつ R_2 および R_3 、 R_6 および R_7 、ならびに R_8 および R_9 は単結合を表し、かつ R_{10} は $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$ を表す。

【0085】

一実施態様において、 R_7 はOHを表し、 R_8 はHを表し、かつ R_4 および R_5 、 R_6 および R_2 、ならびに R_3 および R_9 は単結合を表し、かつ R_{10} は $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$ を表す。

一実施態様において、 R_8 はOHを表し、 R_9 はHを表し、かつ R_4 および R_5 、 R_6 および R_7 、ならびに R_2 および R_3 は単結合を表し、かつ R_{10} は $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$ を表す。

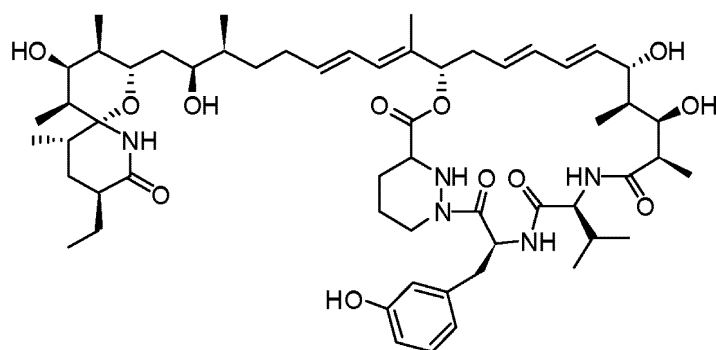
好ましくは、 R_1 は部分Cを表す。

好ましくは、 R_{11} はHを表す；

【0086】

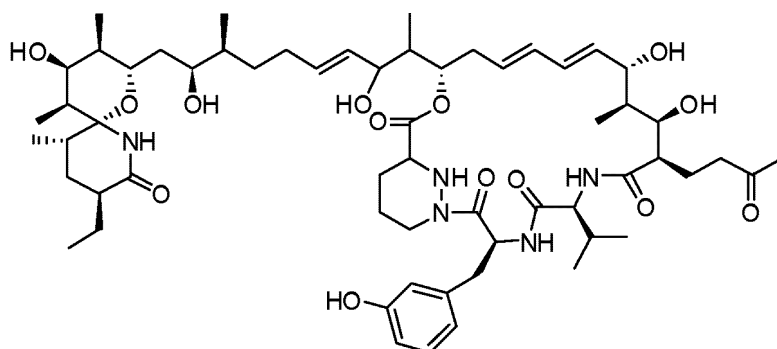
具体的な実施態様には下記を含む：

【化3】



(該実施態様は、任意にモジュール13のATを、SFA生合成遺伝子クラスターにおいてマロン酸メチルを受け入れるATモジュールと交換するとともに、sfaKの欠失/失活によって製造されると期待され得る。)；

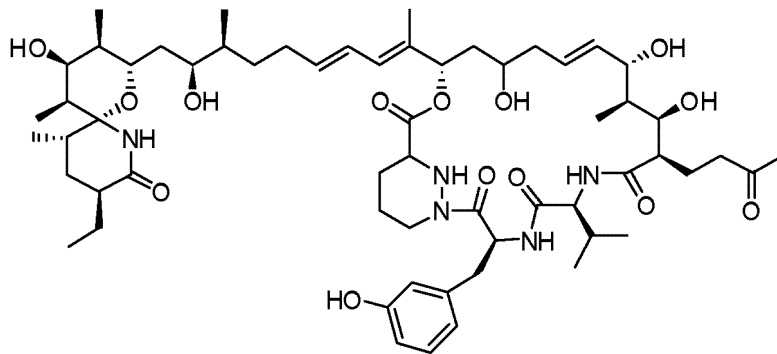
【化4】



(該実施態様は、SFA生合成遺伝子クラスターにおけるモジュール8のDHの欠失/失活によ

って製造されると期待され得る。) ;

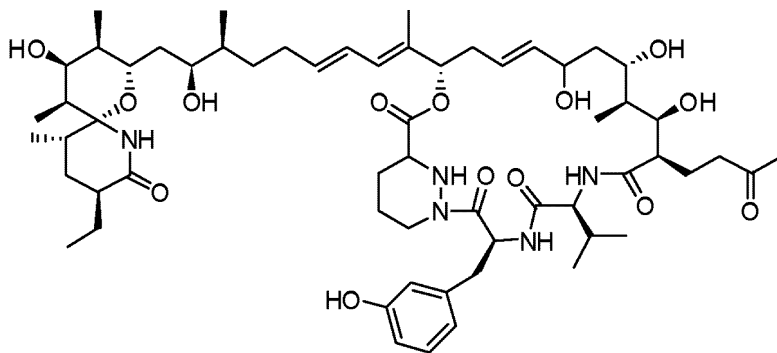
【化 5】



10

(該実施態様は、SFA生合成遺伝子クラスターにおけるモジュール10のDHの欠失 / 失活によって製造されると期待され得る。) ;

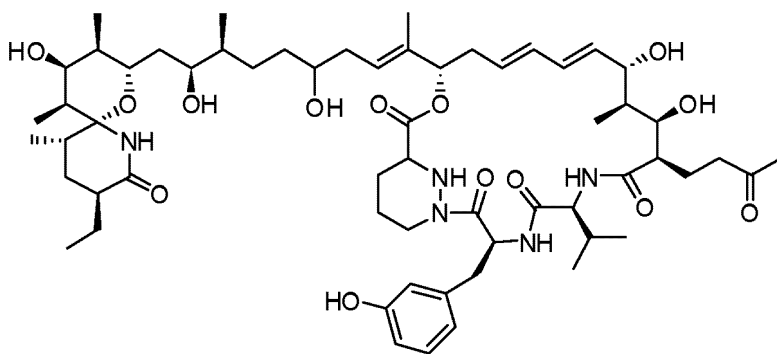
【化 6】



20

(該実施態様は、SFA生合成遺伝子クラスターにおけるモジュール11のDHの欠失 / 失活によって製造されると期待され得る。) ;

【化 7】

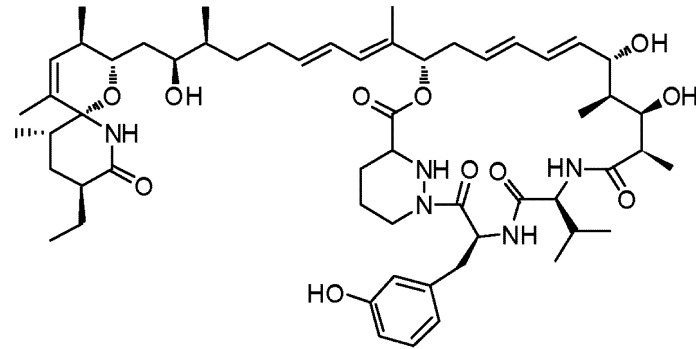


30

(該実施態様は、SFA生合成遺伝子クラスターにおけるモジュール7のDHの欠失 / 失活によって製造されると期待され得る。) ;

40

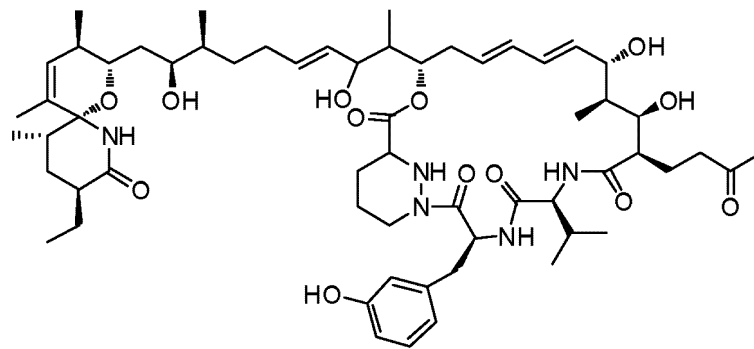
【化 8】



10

(該実施態様は、任意にモジュール13のATをSFA生合成遺伝子クラスターにおけるマロン酸メチルを受け入れるATモジュールと交換するとともに、sfaKの欠失 / 失活によって製造されると期待され得る。) ；

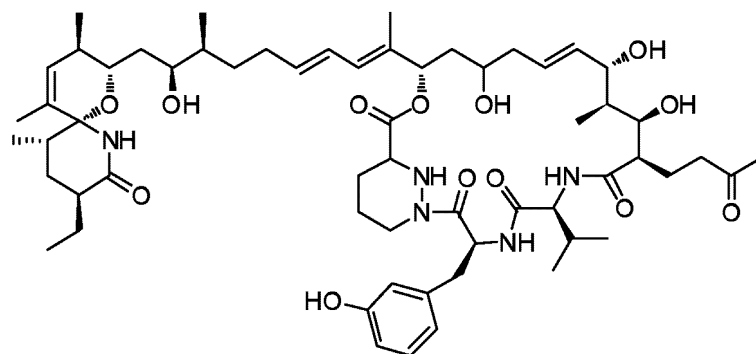
【化 9】



20

(該実施態様は、SFA生合成遺伝子クラスターにおけるモジュール8のDHの欠失 / 失活によって製造されると期待され得る。) ；

【化 10】

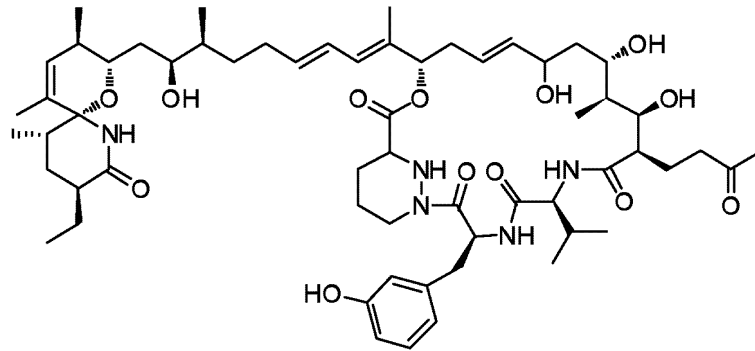


30

(該実施態様は、SFA生合成遺伝子クラスターにおけるモジュール10のDHの欠失 / 失活によって製造されると期待され得る。) ；

40

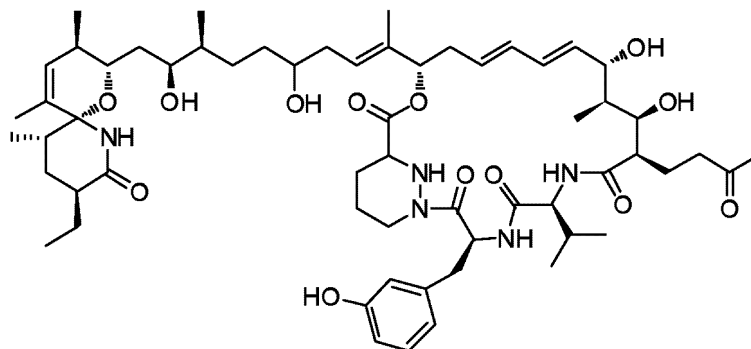
【化 1 1】



10

(該実施態様は、SFA生合成遺伝子クラスターにおけるモジュール11のDHの欠失 / 失活によって製造されると期待され得る。) ;

【化 1 2】



20

(該実施態様は、SFA生合成遺伝子クラスターにおけるモジュール7のDHの欠失 / 失活によって製造されると期待され得る。) ;

およびそれらの医薬として許容し得る塩。

【0087】

先の構造は、代表的な互変異性体を示し、本発明は、式(Ⅰ)および式(Ⅱ)の化合物のすべての互変体を、例えば、エノール化合物が示されているケト化合物を包含し、逆もまたそうである。

30

本発明は、先に示されるように式(Ⅰ)および式(Ⅱ)によって定義される化合物のすべての立体異性体を包含する。

【0088】

さらなる態様において、本発明は、サングリフェリン類似体産生株を培養すること、および任意で、産生された化合物を単離することによって、先の式(Ⅰ)または式(Ⅱ)によって定義される類似体などのサングリフェリン類似体の製造のためのプロセスを提供する。

さらなる態様において、本発明は、医薬として使用するための、式(Ⅰ)および式(Ⅱ)の化合物またはそれらの医薬として許容し得る塩などのサングリフェリン類似体を提供する。

40

【0089】

式(Ⅰ)および式(Ⅱ)の上記の化合物もしくはそれらの医薬として許容し得る塩またはそれらの製剤は、局所的に(例えば、吸入による、腔的に、鼻腔内に、または目もしくは耳への滴下による)、経腸的に(例えば、経口的にまたは直腸的に)、または非経口的に(例えば、静脈内注射、陰茎海綿体内注射、皮下注射、筋肉内注射、心内注射、または腹腔内注射による)、または医用装置を介して(例えば、ステントを介して)を含む任意の従来の方法によって投与され得る。治療は、経時的に単回用量または複数回用量からなり得る。

50

【0090】

サングリフェリンAまたは式(Ⅰ)および(Ⅱ)の化合物またはそれらの医薬として許容し得る塩などの類似体が単独で投与することが可能であるが、1つ以上の医薬として許容し得る希釈剤または担体とともに、医薬組成物として該サングリフェリンAまたは類似体を呈することが好ましい。希釈剤または担体は、本発明の化合物と適合性があるという点で「生理学的に許容し得」なければならない、そのレシピエントに対して有害であってはならない。いくつかの場合、希釈剤または担体は、滅菌済みでありかつ発熱物質を含まない水または塩類溶液であろう。

【0091】

製剤は、簡便に単位剤形で呈されてもよく、製薬の分野で周知の任意の方法によって調製され得る。このような方法には、活性成分(本発明の化合物)を、1つ以上の付属成分を構成する担体と組み合わせる工程を含む。一般に、組成物は、活性成分を液体担体または細かく分割した固体担体または両方と均一かつ完全に組み合わせること、次に、必要な場合、製品を成形することによって調製される。

10

【0092】

錠剤は、微結晶セルロース、ラクトース、クエン酸ナトリウム、炭酸カルシウム、リン酸水素カルシウム、およびグリシンなどの賦形剤、デンプン(好ましくは、トウモロコシデンプン、ジャガイモデンプン、またはタピオカデンプン)、デンプングリコール酸ナトリウム、クロスカルメロースナトリウム、およびあるケイ酸錯体などの崩壊剤、ならびにポリビニルピロリドン、ヒドロキシプロピルメチルセルロース(HPMC)、ヒドロキシプロピルセルロース(HPC)、スクロース、ゼラチン、およびアカシアなどの造粒結合剤を含んでもよい。さらにステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸、ペヘン酸グリセリル、及びタルクなどの平滑剤を含んでもよい。

20

【0093】

また、類似の種類の固体組成物を、ゼラチンカプセルにおける充填剤として採用してもよい。この点における好ましい賦形剤には、ラクトース、デンプン、セルロース、乳糖、または高分子量ポリエチレングリコールを含む。水性の懸濁液および/またはエリキシル剤については、本発明の化合物を、種々の甘味料または調味料、着色物質または色素と、乳化剤および/または懸濁剤と、ならびに水、エタノール、プロピレングリコール、およびグリセリンなどの希釈剤と、ならびにこれらの組み合わせと組み合わせてもよい。

30

【0094】

錠剤は、任意で1つ以上の付属成分とともに、圧縮または成形によって製造されてもよい。圧縮された錠剤は、任意に結合剤(例えば、ポビドン、ゼラチン、ヒドロキシプロピルメチルセルロース)、潤滑剤、不活性希釈剤、保存料、崩壊剤(例えば、デンプングリコール酸ナトリウム、架橋したポビドン、架橋したカルボキシメチルセルロースナトリウム)、界面活性剤または分散剤と混合した散剤または顆粒剤などの自由に流動する形態の活性成分を、適切な機械において圧縮することによって調製してもよい。成形された錠剤は、不活性液体希釈剤で湿潤化した粉末状化合物の混合物を適切な機械において成形することによって製造され得る。錠剤は任意で被覆またはスコア化してもよく、錠剤において活性成分の遅放性または徐放性を提供するように、例えば変動する割合でヒドロキシプロピルメチルセルロースを用いて望ましい放出特性を提供するように製剤してもよい。

40

【0095】

経口投与に適した本発明に従った組成物は、あらかじめ決めておいた量の活性成分を各々含むカプセル剤、オブラート剤、または錠剤などの離散した単位として;散剤または顆粒剤として;溶液または水性液体もしくは非水性液体における懸濁液として;あるいは水中油液体エマルジョンまたは油中水液体エマルジョンとして呈されてもよい。また、活性成分は、大形丸剤、舐剤、もしくはペースト剤として呈されてもよい。

【0096】

また、吸入を介した投与に適したエアロゾル組成物も、当技術分野で公知の方法を用いて製造することができる。これに関する例には、散剤の形態(例えば、ミクロン化した)

50

でのまたは微粒化した溶液もしくは懸濁液の形態での吸入による本発明の化合物の投与を含む。エアロゾル組成物は、適切な加圧した噴射剤の中に入れられてもよく、噴霧器または吸入器などの追加的な機器を用いて使用してもよい。

【0097】

外部組織、例えば口および皮膚への適用については、組成物は好ましくは局所的な軟膏またはクリームとして適用される。軟膏に製剤される場合、活性成分は、パラフィン混和性または水混和性のいずれかの軟膏基剤とともに採用されてもよい。あるいは、活性成分は、水中油クリーム基剤または油中水基剤とともにクリームに製剤されてもよい。

【0098】

また、本発明の化合物は、当技術分野で公知の医用装置を用いて投与してもよい。例えば、一実施態様において、本発明の医薬組成物は、米国特許第5,399,163号；米国特許第5,383,851号；米国特許第5,312,335号；米国特許第5,064,413号；米国特許第4,941,880号；米国特許第4,790,824号；または米国特許第4,596,556号に開示された装置などの針なし皮下注射装置を用いて投与することができる。本発明において有用な周知のインプラントおよびモジュールに関する例には下記を含む：制御された速度で薬剤を分配するための埋め込み型マイクロ注入ポンプを開示している米国特許第4,487,603号；皮膚を通じて薬剤を投与するための治療装置を開示している米国特許第4,486,194号；精確な注入速度で薬剤を送達するための薬剤注入ポンプを開示している米国特許第4,447,233号；持続的な薬剤送達のための可変流量埋め込み型注入装置を開示している米国特許第4,447,224号；多重チャンバー区画を有する浸透圧性薬剤送達システムを開示している米国特許第4,439,196号；および浸透圧性薬剤送達システムを開示している米国特許第4,475,196号。多くの他のこのようなインプラント、送達システム、およびモジュールは、当業者に公知である。

化合物は、単独の活性剤、または他の医薬との併用で投与することができる。

【0099】

さらなる態様において、本発明は、免疫障害、炎症性障害、心疾患、ウイルス疾患（HIVおよびHCVなど）、および/または移植片拒絶反応の治療または予防において使用するための、式（I）および（II）の化合物またはそれらの医薬として許容し得る塩などのサングリフェリン類似体を提供する。

【0100】

さらなる態様において、本発明は、免疫障害、炎症性障害、心疾患、ウイルス疾患（HIVおよびHCVなど）、および/または移植片拒絶反応の治療または予防のための薬剤の製造における、式（I）および（II）の化合物またはそれらの医薬として許容し得る塩などのサングリフェリン類似体の使用を提供する。

【0101】

さらなる態様において、本発明は、対象（特にヒト対象）に、治療的有効量の式（I）および（II）の化合物またはそれらの医薬として許容し得る塩などのサングリフェリン類似体を投与することを含む、免疫障害、炎症性障害、心疾患、ウイルス疾患（HIVおよびHCVなど）、および/または移植片拒絶反応の治療または予防のための方法を提供する。

【0102】

完全性のために、本発明者らは、本発明の下記のさらなる態様を提供する：

- 下記である、サングリフェリンA生合成の原因である24個の遺伝子を含むことを特徴とする、免疫抑制薬サングリフェリンAの生合成遺伝子クラスター：

1) sfaDが、塩基19885～30714における遺伝子クラスターのヌクレオチド配列に位置し、10830塩基対の長さであり、3609個のアミノ酸からなる非リボソームペプチドシンターゼをコードする、1つの非リボソームペプチド主鎖（peptide backbone）シンターゼ（NRPS）遺伝子；

2) sfaEが、塩基30707～37360における遺伝子クラスターのヌクレオチド配列に位置し、6654塩基対の長さであり、2217個のアミノ酸からなるポリケチドシンターゼをコードし；

sfaFが、塩基37394～50014における遺伝子クラスターのヌクレオチド配列に位置し、12

10

20

30

40

50

621塩基対の長さであり、4206個のアミノ酸からなるポリケチドシンターゼをコードし；
sfaGが、塩基50017～60903における遺伝子クラスターのヌクレオチド配列に位置し、10
887塩基対の長さであり、3628個のアミノ酸からなるポリケチドシンターゼをコードし；
sfaHが、塩基60918～85823における遺伝子クラスターのヌクレオチド配列に位置し、24
906塩基対の長さであり、8301個のアミノ酸からなるポリケチドシンターゼをコードし；
sfaIが、塩基85823～96040における遺伝子クラスターのヌクレオチド配列に位置し、10
218塩基対の長さであり、3405個のアミノ酸からなるポリケチドシンターゼをコードする
、5つのI型直鎖ポリケチドシンターゼ（PKS）遺伝子sfaE、sfaF、sfaG、sfaH、sfaI；
3）sfaKが、塩基97396～101943における遺伝子クラスターのヌクレオチド配列に位置し
、4548塩基対の長さであり、1515個のアミノ酸からなるポリケチドシンターゼをコードす
る、1つのI型反復性ポリケチドシンターゼ遺伝子sfaK； 10
4）sfaAが、塩基17024～17854における遺伝子クラスターのヌクレオチド配列に位置し
、831塩基対の長さであり、276個のアミノ酸からなるフェニルアラニンメタ-ヒドロキシ
ラーゼをコードし；
sfaBが、塩基17851～19191における遺伝子クラスターのヌクレオチド配列に位置し、13
41塩基対の長さであり、446個のアミノ酸からなるN5-オルニチンオキシゲナーゼをコード
し；
sfaJが、塩基96225～97391における遺伝子クラスターのヌクレオチド配列に位置し、11
67塩基対の長さであり、388個のアミノ酸からなるジンクフィンガー脱水素酵素をコード
し； 20
sfaMが、塩基103210～103929における遺伝子クラスターのヌクレオチド配列に位置し、
720塩基対の長さであり、239個のアミノ酸からなる短鎖デヒドラターゼ/還元酵素をコー
ドし；
sfaNが、塩基104001～105023における遺伝子クラスターのヌクレオチド配列に位置し、
1023塩基対の長さであり、340個のアミノ酸からなるケトシンターゼをコードし；
sfaPが、塩基105366～107216における遺伝子クラスターのヌクレオチド配列に位置し、
1851塩基対の長さであり、616個のアミノ酸からなるアスパラギンシンターゼ類似体をコ
ードし；
sfaQが、塩基107366～108145における遺伝子クラスターのヌクレオチド配列に位置し、
780塩基対の長さであり、259個のアミノ酸からなるチオエステラーゼをコードし； 30
sfaRが、塩基108150～109511における遺伝子クラスターのヌクレオチド配列に位置し、
1362塩基対の長さであり、453個のアミノ酸からなるクロトニル-CoA還元酵素をコードし
；
sfaLが、塩基101936～103213における遺伝子クラスターのヌクレオチド配列に位置し、
1278塩基対の長さであり、ポリケチドシンターゼにおけるトランスアシル化ドメインに高
度に相同性のある425個のアミノ酸からなるアシルトランスフェラーゼをコードし；
sfaOが、塩基105091～105345における遺伝子クラスターのヌクレオチド配列に位置し、
255塩基対の長さであり、84個のアミノ酸からなるアシルキャリアータンパク質をコード
する、前駆体合成のための10個の機能的遺伝子sfaA、sfaB、sfaJ、sfaM、sfaN、sfaP、sf
aQ、sfaR、sfaL、sfaO； 40
5）sfaCが、塩基19193～19888における遺伝子クラスターのヌクレオチド配列に位置し
、696塩基対の長さであり、231個のアミノ酸からなる転写調節因子をコードし；
sfaSが、塩基109583～109798における遺伝子クラスターのヌクレオチド配列に位置し、
216塩基対の長さであり、71個のアミノ酸からなるMbtH因子をコードする、2つの調節遺伝
子sfaCおよびsfaS；
6）sfaU1が、塩基14973～15413における遺伝子クラスターのヌクレオチド配列に位置し
、441塩基対の長さであり、146個のアミノ酸からなる機能的に未知のタンパク質をコード
し；
sfaU2が、塩基15596～16063における遺伝子クラスターのヌクレオチド配列に位置し、4
68塩基対の長さであり、155個のアミノ酸からなる機能的に未知のタンパク質をコードし 50

；
sfaV1が、塩基109776～110312における遺伝子クラスターのヌクレオチド配列に位置し、537塩基対の長さであり、178個のアミノ酸からなる機能的に未知のタンパク質をコードし；

sfaV2が、塩基111285～111743における遺伝子クラスターのヌクレオチド配列に位置し、459塩基対の長さであり、152個のアミノ酸からなる機能的に未知のタンパク質をコードし；

sfaV3が、塩基112218～112652における遺伝子クラスターのヌクレオチド配列に位置し、435塩基対の長さであり、144個のアミノ酸からなる機能的に未知のタンパク質をコードする、機能的に未知のタンパク質をコードする5個の遺伝子sfaU1、sfaU2、sfaV1、sfaV2、sfaV3。

10

- 下記のモジュールまたはドメインを含むことを特徴とする、サングリフェリンA生合成遺伝子クラスターにおける非リボソームペプチドシンターゼ：ペプチジル縮合酵素ドメインC、アデニル化ドメインA、ペプチジルキャリアータンパク質PCP、および末端基環化のための末端ドメインC。

- 下記のモジュールまたはドメインを含むことを特徴とする、サングリフェリンA生合成遺伝子クラスターにおけるポリケチドシンターゼ：ケト縮合ドメインKS、トランスアシル化ドメインAT、アシルキャリアータンパク質ドメインACP、脱水素ドメインDH、ケト還元ドメインKR、およびエノール還元ドメインER。

- 免疫抑制薬サングリフェリンAおよびそのファミリーの任意の対応する類似体の触媒合成のための、サングリフェリンA生合成遺伝子クラスターによってコードされる任意のタンパク質の使用。

20

- ハイブリッドポリケチド-非リボソームペプチドの主鎖の触媒合成のための、サングリフェリンA生合成遺伝子クラスターによってコードされる任意のタンパク質の使用。

- 遺伝子修飾がなされ、かつ得られた突然変異株の生物学的発酵が、位置21および25においてヒドロキシル化されたものなどのサングリフェリンAの非天然類似体を産生する、サングリフェリンA生合成遺伝子クラスターの使用。

- 遺伝子修飾がなされ、かつ得られた突然変異株の生物学的発酵が、相補的生成物である、位置14におけるメチル基と置換されたサングリフェリンAの非天然類似体を産生する、サングリフェリンA生合成遺伝子クラスターの使用。

30

【図面の簡単な説明】

【0103】

【図1】サングリフェリン（サングリフェリンAならびに類似体B、C、およびD）の化学構造

【図2】SFA生合成遺伝子クラスターの遺伝子組織化および制限マップ。（A）ストレプトミセス属A92-308110（ストレプトミセス・フラベオルス）ゲノムの最大150kbのDNA領域を表す4つの重複したコスミド（Bは、制限酵素BamHIを表し、実線は、すでにDNA配列が決定された部分を表し、プローブP1～P4は、標識されたプローブを表す。）；（B）SFA生合成遺伝子クラスターの遺伝子組織化。未知：未知の遺伝子；PKS：ポリケチドシンターゼ遺伝子；NRPS：非リボソームペプチドシンターゼ遺伝子；クラスター越え；境界の外側の遺伝子；トランスポゼース：トランスポゾン；修飾：前駆体合成遺伝子

40

【図3】SFAの各構築ブロックについて提唱される生合成経路。（A）ピペラジン酸；（B）開始単位；（C）特別な伸長単位。sfaXを用いて標識される工程において、Xは、本明細書に記載された遺伝子クラスターにおける個々の遺伝子によってコードされるタンパク質に対応し；記号「？」を用いた標識工程は、該工程が、この遺伝子クラスターの遺伝子によってコードされる酵素によって実施されるかどうか、または一次代謝に関与する酵素の助力によって生体内で実施されるかどうかはなおも明瞭ではないことを意味し；任意の標識のない工程は、該工程が一次代謝プロセスの助力によって実施され得ることを意味する。

【図4】SFA骨格形成のための経路。PKS：ポリケチドシンターゼ；NRPS：非リボソームペ

50

プチドシンテターゼ；KS：ケト合成のための機能ドメイン；AT：アシル転移のための機能ドメイン；KR：ケト還元のための機能ドメイン；ER：エノール還元のための機能ドメイン；DH：脱水素のための機能ドメイン；ACP：アシルキャリアタンパク質；C：ペプチド縮合のための機能ドメイン；A：アデニル化のための機能ドメイン；PCP：ペプチジルキャリアタンパク質。

【図5】クローンプローブによってSFA生合成遺伝子クラスターの配列の中断から派生した発酵産物の高性能液体クロマトグラフィー（HPLC）分析。WT：野生型；標準物質：SFA標準物質；突然変異体：突然変異株。

【図6】遺伝子置換から結果として生じる突然変異株の発酵産物に関する高性能液体クロマトグラフィー（HPLC）分析。（A）野生型、（B）亜鉛結合脱水素酵素遺伝子sfaJのノックアウト突然変異体、（C）反復性直鎖ポリケチドシンテターゼ遺伝子sfaKのノックアウト突然変異体、（D）アシルトランスフェラーゼ遺伝子sfaLのノックアウト突然変異体、（E）短鎖脱水素酵素遺伝子sfaMのノックアウト突然変異体、（F）フェニルアラニンヒドロキシラーゼ遺伝子sfaAのノックアウト突然変異体、（G）オルニチンオキシゲナーゼ遺伝子sfaBのノックアウト突然変異体、（H）脂肪酸ケトシンテターゼ遺伝子sfaNのノックアウト突然変異体、（I）アスパラギンシンテターゼ類似体遺伝子sfaPのノックアウト突然変異体、（J）クロトニルCoA還元酵素遺伝子sfaRのノックアウト突然変異体、（K）未知のタンパク質sfaU1に左側で隣接しているノックアウト突然変異体、（L）TetR調節因子に左側で隣接しているノックアウト突然変異体、（M）モジュール8の位置指定突然変異誘発のDHドメイン、（N）モジュール10の位置指定突然変異誘発のDHドメイン。ストレプトミセス属A92-308110（ストレプトミセス・フラベオルス）；mv.：突然変異株（野生型と区別するために用いられる標識）；ツェカンゲンシス（tsekangensis）：T突然変異体（SFTを産生）；ハサンゲンシス（hasangensis）：H突然変異体（SFHを産生）；クウェンゲンシス（xuwengensis）：X突然変異体（SFXを産生）

【図7】提唱される生合成経路を含む要約図 図3のモジュール番号付けは、図7のものによって替えられている。それゆえ、モジュール番号を本明細書で引用する場合、モジュール番号は図7において引用されているものである。

【発明を実施するための形態】

【0104】

（配列表の配列に関する説明）

配列番号1の配列：SFA生合成遺伝子クラスターの核酸配列

配列番号2の配列：SfaU1のアミノ酸配列

配列番号3の配列：SfaU2のアミノ酸配列

配列番号4の配列：SfaAのアミノ酸配列

配列番号5の配列：SfaBのアミノ酸配列

配列番号6の配列：SfaCのアミノ酸配列

配列番号7の配列：SfaDのアミノ酸配列

配列番号8の配列：SfaEのアミノ酸配列

配列番号9の配列：SfaFのアミノ酸配列

配列番号10の配列：SfaGのアミノ酸配列

配列番号11の配列：SfaHのアミノ酸配列

配列番号12の配列：SfaIのアミノ酸配列

配列番号13の配列：SfaJのアミノ酸配列

配列番号14の配列：SfaKのアミノ酸配列

配列番号15の配列：SfaLのアミノ酸配列

配列番号16の配列：SfaMのアミノ酸配列

配列番号17の配列：SfaNのアミノ酸配列

配列番号18の配列：SfaOのアミノ酸配列

配列番号19の配列：SfaPのアミノ酸配列

配列番号20の配列：SfaQのアミノ酸配列

配列番号21の配列：SfaRのアミノ酸配列

配列番号22の配列：SfaSのアミノ酸配列

配列番号23の配列：SfaV1のアミノ酸配列

配列番号24の配列：SfaV2のアミノ酸配列

配列番号25の配列：SfaV3のアミノ酸配列

配列番号26～29の配列：実施例1に記載されたプライマー配列

配列番号30および31の配列：実施例11に記載されたプライマー配列

配列番号32～47の配列：実施例12に記載されたプライマー配列

配列番号48～63の配列：実施例14に記載されたプライマー配列

配列番号64～67の配列：実施例16に記載されたプライマー配列

10

【0105】

（一般的な方法）

一般に、Maniatisらの文献（1998）、SambrookおよびRussellの文献（2001）、またはKieserらの文献（1999）に記載されているような方法を用いた。例または代替的な方法を以下に詳述する。

（細菌株およびプラスミド）

大腸菌DH10B（GibcoBRL）をSambrookおよびRussellの文献（2001）によって記載されているように、2×TY培地において増殖させ、大腸菌ET12567（pUZ8002）をPagetらの文献（1999）に記載されているように、カナマイシン（25mg/L）およびクロラムフェニコール（12.5mg/L）を有する2×TY培地において増殖させた。大腸菌形質変換体を、100mg/Lのアンピシリンまたは50mg/Lのアブラマイシンを用いて選択した。

20

【0106】

用いたほとんどのプラスミドは、Kieserらの文献（1999）およびSambrookらの文献（2001）に記載されている。pBS3030としても公知のpTV1は、Chengらの文献（2003）に記載されており、pIJ773は、GenBank受託番号AX657066.1に記載されている。pANT841は、Genbank：AF438749に記載されている。

サングリフェリン産生株であるストレプトミセス属A92-308110（ストレプトミセス・フラベオルス）は、DSMZ, Braunschweig, Germanyからストレプトミセス属DSM 9954として得られ得る。

【0107】

30

（培地レシピ）

（AS-1アガー培地：）

【表1】

	g/100mL
酵母抽出物	0.1
L-アラニン	0.02
L-アルギニン	0.05
可溶性デンプン	0.5
NaCl	0.25
Na ₂ SO ₄	1.0
アガー	2.0
蒸留水で100mLにする	
培地をNaOHによってpH7.5に調整する；	

40

（ISP4アガー培地：）

50

【表 2】

	g/L	
可溶性デンプン	10	
K ₂ HPO ₄	1	
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1	
NaCl	1	
(NH ₄) ₂ SO ₄	2	10
CaCO ₃	2	
ISP微量塩溶液	1 mL	
アガー	20	
蒸留水で1000mLにし、pH7.2に調整した後に滅菌		

(ISP微量塩溶液：)

【表 3】

	g/L	
FeSO ₄ ·7H ₂ O	1	
MnCl ₂ ·4H ₂ O	1	
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1	
蒸留水で1000mLにする		

(IWL-4アガー培地：)

1LあたりのISP-4培地に1gのトリプトンおよび0.5gの酵母抽出物を添加し、培地をNaOHによってpH7.2に調整することによって、IWL-4アガー培地を調製した。

【0108】

(接合の一般的な方法)

関心対象のプラスミドを含むドナー細菌大腸菌S17-1を、50 μg/mLのアブラマイシンを補充した3~4mLのLBブロスにおける試験管へと接種し、一晚振盪した。次に、250mLフラスコにおける50 μg/mLアブラマイシンを補充した50mLのLBに500 μLを37℃で接種し、0.5のOD600まで増殖させた。細胞を50mLのエッペンドルフチューブに、3800rpmで10分間の遠心分離によって回収した。次に、細胞を20mLのLBでボルテックスによって再懸濁し、再度回収した。これを2回反復し、回収した細胞を1mLのLBに再懸濁した。アクセプター細菌であるストレプトミセス属A92-309110 (ストレプトミセス・フラベオルス) を12000rpmで3分間遠心分離して、胞子を回収し、500 μLの0.1M TESにおいて2回再懸濁した後、50℃で10分間熱ショックを与え、500 μLのTSBブロスを添加した。これを次に、次に胞子を37℃で4~5時間インキュベートした。胞子を回収し、1mLのLBに再懸濁した。細菌を1:99~99:1の割合で混合し、1:1で一般に、形質転換が成功した。混合した細菌をMSアガーの上に延展し、プレートを層状フローキャビネットにおいて乾燥させた。次に、プレートを30℃で14~16時間インキュベートした。プレートを再度3~4mLの滅菌水で延展し、大腸菌のほとんどを除去して、プレートを層状フローキャビネットにおいて1時間乾燥させた。次に、プレートを、アブラマイシンを最大1mg/mLおよびナリジクス酸を最大1mg/mL含む1mLの滅菌水で上塗りし、30℃で3~5日間インキュベートした。1つまたは2つまたはそれより多くの単一クローンを選択し、アブラマイシンを30 μg/mLで有する3mLのTSBブロスに接種し、30℃で数日間振盪させた。100 μLの新鮮培養物をISP-4アガーに延展し、2~3日間のイ

ンキュベーションによって二重のクロスオーバーを生じさせた。

【0109】

(ストレプトミセス属A92-309110(ストレプトミセス・フラベオルス)からの全DNAの抽出)

- 80 で保存したストレプトミセス属A92-309110(ストレプトミセス・フラベオルス)胞子懸濁液を3mLのYEME培地に接種した。培地を30 で12時間インキュベートし、1.5mLのエッペンドルフチューブへと2つの部分で移し、遠心分離し、細菌を回収した。細菌を500 μ LのSTE溶液に再懸濁し; リゾチームを4mg/mLの終濃度まで添加した後、37 の水槽で30~45分間インキュベートした。細菌がなった後、透明かつゲル様の物質になるまで観察。次に、250 μ Lの2% SDSおよび60 μ Lの5mol/L KAcを添加し、十分に混合し、- 20 で10分間凍結した後、12000rpmで10分間遠心分離した。上清を新たなエッペンドルフ1.5mLチューブに移した。500 μ Lの1:1(v/v) フェノール/クロロホルム混合物を添加し、10000rpmで3分間遠心分離した。この工程を、白色の変性したタンパク質が界面にもはや現れなくなるまで数回反復した。次に、クロロホルムだけを別の最終的な抽出に用いた。上清を除去し、等容積のイソプロパノールと十分に混合し、室温で30分間放置して、DNAを沈殿させ、10000rpmで5分間遠心分離した。70%アルコールを用いた洗浄および吸引フィルターによる乾燥の後、200 μ LのTE緩衝液および10 μ Lの10mg/mL DNase非含有RNaseを添加し、保存のために- 20 で凍結させた。

10

【0110】

(SFA産生株ストレプトミセス属A92-309110(ストレプトミセス・フラベオルス)および関連株の発酵、産生物の単離、精製、および同定)

20

(a) 液体発酵)

胞子ストックから50 μ L(平均濃度 1×10^8 / mL)を、適切な抗生物質負荷(突然変異体の抵抗マーカーに応じてアブラマイシン50 μ g / mLまたはエリスロマイシン50 μ g / mL)の下で、3mLのTSB(Tryptic Soytone Broth, Sigma)に移し、(27 、250rpmで)30時間振盪させた。一次培養物から、1mLを250mLのエrlenmeyerフラスコ(直径、下部で8.5cm、口部で3.5cm; 高さ、15cm)50mLの種子培地に移し、振盪させた(27 、250rpm)。

【0111】

種子培養物から5mLを500mLのエrlenmeyerフラスコ(直径: 下部で10.5cm、口部で4cm、高さ: 18cm)における90mL産生培地に移し、25 (250rpm)で24時間増殖させ、この時点で、4g樹脂XAD-16を含む10mLの新鮮産生培地を産生培養物に添加した(100mLの産生培地における合計4gのXAD-16)。培養物を先の条件(25 、220rpm)でさらに3日間インキュベートした。

30

【0112】

発酵を4日目に完了させた後、発酵プロセスを吸引による助力で濾紙を通過させた。その上に残っている材料を有する濾紙をビーカーに移し、- 80 で30分間凍結させ、一晚凍結乾燥させた。80~100mLのメタノールを、乾燥した材料に添加し、40分間攪拌し、吸引を用いて濾過した。濾過した材料をメタノールで二回目の抽出を実施し、吸引を用いて濾過した。樹脂を廃棄し、メタノール溶液をプールし、35~37 で真空下において乾燥させた。乾燥するまで蒸発させた後、2分割量の750 μ Lメタノールを用いて材料を移した。2つのメタノール溶液をプールし、1.5mLの一定分量をエッペンドルフチューブに移し、- 20 で1時間凍結させた。チューブを4 、12000rpmで10分間遠心分離した。上清を新たなエッペンドルフチューブに移し、真空下で、およそ500 μ Lの液体が残るまで乾燥させた後、4 で保存した。

40

【0113】

先に説明したように得られたおよそ300 μ Lの粗抽出物を、40mLの40%アセトニトリル含有水であらかじめすすいで置いたフラッシュカラムクロマトグラフィー(RP-18)を通じて精製した。次に、カラムを40mLの50%アセトニトリル含有水で溶出し、40mL画分を個別のチューブに回収した後、濃縮した。あらかじめ処理しておいた試料をさらに、単離および同定のために、LC-MS(1%ギ酸を含む80%アセトニトリル使用)を用いて精製した。

50

【0114】

(b) 固体発酵)

いくつかのアガープレートの接種のために、40 μ Lの孢子ストックを3mLのTSB培地に移し、37 $^{\circ}$ Cで一晩インキュベートした(その間、250rpmで振盪)。この一晩の培養物から、400~500 μ Lを、R2YE、IWL-4、ISP-4、またはAS-1のいずれかのアガー培地から製造されたアガープレート(150mm)の表面に移して均等に延展した。あるいは、一定分量(50 μ L)の孢子ストックを用いて、アガープレートに直接接種することができる。接種したアガープレートを30 $^{\circ}$ Cで6~7日間インキュベートした。

【0115】

インキュベーション期間の終了時に、アガー培地上の培養物を250mLビーカーに回収し、細かくした。200mLのメタノールを1つのアガープレートからの材料に添加し、混合物を2時間攪拌した後、吸引による助力で濾紙を用いて濾過した。固体材料を廃棄し、濾液を回転式蒸発機で乾燥させた。発酵産物を回収するために、2つの500 μ L分割量のメタノールを用いて、乾燥した材料を再懸濁し、1.5mLのエッペンドルフチューブに移した。メタノール濃縮物から材料を精製した後、液体発酵プロセスのために先に説明したのと類似の手順に従った。しかしながら、固体培地における水含有量が少しであるので、凍結乾燥工程は省略することができる。単離および同定のためにLC-MS(1%ギ酸を含む80%アセトニトリル含有水使用)を用いて試料をさらに精製した。

【0116】

(PCRによるSFA生合成遺伝子のクローニング)

PCRシステムは下記を含む: DMSO(8%(v/v))、MgCl₂(25mM)、dNTP(2.5mM)、縮重プライマー(10 μ M)、Taq DNAポリメラーゼ(2.5 μ L)、およびテンプレートとしての適切な量のストレプトミセス属A92-309110(ストレプトミセス・フラベオルス)の全DNA。まず、95 $^{\circ}$ C、3分、1周期;次に、94 $^{\circ}$ C、1分、68 $^{\circ}$ C、1分、72 $^{\circ}$ C、2分、5周期;94 $^{\circ}$ C、1分、65 $^{\circ}$ C、1分、72 $^{\circ}$ C、2分、30周期;最後に、72 $^{\circ}$ C、10分、1周期。PCRが終了した後、1%アガロースゲル電気泳動を用いて結果を検討した。所望の大きさのDNA断片を低融点ゲルから回収し、pGEM T Easyベクターと連結した。大腸菌DH5 コンピテント細胞を形質転換し、アンピシリン、IPTG(イソプロピル- β -D-チオガラクトピラノシド)を含むLBプレートに延展し、X-gal(5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル- β -D-ガラクトシド)を青色-白色選択に用いた。白色細菌コロニーを一晩培養物に関して拾い、プラスミドを抽出した。プラスミドが所望の大きさの挿入されたDNA断片を含んでいるかどうかは、EcoRI消化によって評価した。次に、これらのプラスミドを配列決定した。

【0117】

(核酸ハイブリダイゼーション)

評価されるべき突然変異株の数 μ Lの菌糸体または孢子を3mLのTSB培地に接種し、220rpmで振盪し、培地が増粘されるまで30 $^{\circ}$ Cで培養した。次に、ゲノムDNAを抽出した。配列分析に基づいて、ハイブリダイゼーション戦略を設計し、プローブを調製し、適切な制限酵素部位をゲノムDNA消化のために選択した。

【0118】

沸騰している水槽において15 μ Lのプローブ(0.5~3 μ gDNA含有)を10分間インキュベートした後、すぐに塩-氷槽へと移して冷却させた。2 μ Lのヘキサヌクレオチド混合物(10 \times)、2 μ L dNTP標識混合物、1 μ L標識済みクレノー酵素を連続して添加し、十分に混合した後、混合物を37 $^{\circ}$ Cの水槽において16時間インキュベートした。0.8 μ Lの0.8M EDTA(pH=8.0)を添加して反応を停止させ、2.5 μ Lの4M LiClを添加して十分に混合した。75 μ Lのあらかじめ冷蔵しておいた無水アルコールを沈殿のために添加した。混合物を-80 $^{\circ}$ Cで40分間凍結させ、4 $^{\circ}$ C、12000rpmで20分間遠心分離した。DNAを回収し、70%のあらかじめ冷蔵しておいたアルコールで洗浄し、真空乾燥させ、50 μ LのTE緩衝液に溶解し、4 $^{\circ}$ Cで保存した。電気泳動後、アガロースゲルを0.25M HClにおいて20分間浸漬し、脱イオン水ですすいだ後、塩基性緩衝液を添加した後に穏やかに振盪しながらさらに20分間浸漬した。緩衝液を1回交換した後、ゲルをさらに20分間浸漬した。脱イオン水で数回洗浄した後、D

10

20

30

40

50

NAをナイロンメンブレンに転移させた。転移装置（BioRad）を転移に用いた。装置の説明書に従って、1片の湿潤濾紙を下部プレートに置いた後、適切な大きさのナイロンメンブレンを重ねた。メンブレンは各側においてゲルよりも1cm大きくすべきであり、次に、プラスチックメンブレンを重ね、締め金を固定する。アガロースゲルを先に説明したとおり処理した後、メンブレン孔の上に配置した。装置を真空ポンプと接続した後、負荷を調整して、5～8mmHgに維持する。真空密封シールを形成した後、ほぼ1Lの10×SSCハイブリダイゼーション緩衝液を添加し、液体表面はアガロースゲルを覆うべきである。転移を2時間実施する。次に、120 のオープンにおいて40分間焼結させることによって、またはそれに替わるものとして紫外線光（2J/cm²）に曝露することによって固定を実施してもよい。次に、使用前にメンブレンを冷暗所に保存する。固定したナイロンメンブレンをハイブリダイゼーションチューブへと置き、ハイブリダイゼーション溶液を添加する。前ハイブリダイゼーションを64 で30分間実施した後、プローブを添加し、ハイブリダイゼーションを所望の温度で16時間実施した。メンブレンを室温で2×SSC厳密的洗浄緩衝液を用いて5分間2回連続して洗浄し；次に、64 で0.5×SSC厳密的洗浄緩衝液を用いて15分間2回洗浄した。厳密的洗浄の後、ナイロンメンブレンをまず洗浄緩衝液で1～5分間平衡化し、次にブロッキング溶液とともに30分間インキュベートし、次に、抗体溶液とともに30分間インキュベートした。洗浄緩衝液を用いた1～2回の洗浄の後、ナイロンメンブレンを検出緩衝液で2～5分間平衡化した。顕色緩衝液を添加し、メンブレンを暗所で顕色させた。適切な強度に到達すると、メンブレンを脱イオン水で洗浄して、反応を停止させ、ハイブリダイゼーションを完了した。

【実施例】

【0119】

下記の文脈における添付の図に関して、さらなる説明が本明細書に対してなされるであろう。

（実施例1：SFA遺伝子クラスターからのクロトニルCoA還元酵素遺伝子断片のクローニング）

これまで、SFAの合成全体は成功して完了しているが、その天然産生経路は、特にピペラジン酸単位のN-N結合の形成の機序および反復性ポリケチドシンターゼをおそらく利用する通常ではないポリケチド伸長単位に関してほとんどわかっていない。過去数年間に於いて、同位体標識した研究は、グルタミン酸およびグルタミンが、ピペラジン酸単位を含む天然産物を製造するある系においてピペラジン酸の生合成前駆体であり得ることを示している（Umezawaらの文献（2001）；Millerらの文献（2007））。ピペラジン酸を含む天然産物のための既存の遺伝子クラスターのおよび他の報告された遺伝子クラスターの分析によると、オルニチンが基質である可能性は排除されず；その上、通常ではない伸長単位が、大環状骨格における側鎖置換基として、通常ではない反復性ポリケチドシンターゼに基づいて形成され得る。先に記載した2つの単位は、新たな薬剤を開発して構造-活性の関連性を研究する上で、重要な役割を担い得る。従って、SFAの生合成機序を解明するために、およびその潜在的な医薬としての価値を発展させるために、SFA生合成遺伝子クラスターの分析が必要である。

【0120】

大環状骨格についてのハイブリッドPKS-NRPS構造に関する分析に基づいて、遺伝子クラスターは、長い直鎖PKS-NRPS領域を有すると仮定され、公知の類似体はなく、生合成遺伝子クラスターの単離およびクローニングが困難であることを増大させるに至る。実際、PKS遺伝子およびNRPS遺伝子のエレメントを用いたプローブ付けによって、11個のPKSクラスターおよび7個のNRPSクラスターに由来するDNAを単離し、次に、遺伝子失活研究に用いた。これらはすべて、サングリフェリンの製造に何ら効果をもたらさなかった。ついに、本発明者らは、プローブとしての他の特定の単位を用いて遺伝子クラスターをうまくクローニングした。エチル基系構造を含むポリケチド天然産物についての天然に生じる生合成遺伝子クラスターの分析によって、本発明者らは、エチルマロニルCoAを構築ブロックとして用いることによって、通常エチル単位が導入されることを示した。本発明者らは、SFA

遺伝子クラスターがCCR類似体を含むかもしれないと考えた。それゆえ、縮重CCRプライマーを設計して、本発明者がストレプトミセス属A92-308110（ストレプトミセス・フラベオルス）ゲノムに存在し得ると考えているエチル単位の生合成を生じるクロトニルCoAシンテターゼの高度に保存された領域の配列をクローニングした。次に、クローン配列をプローブとして標識し、ライブラリースクリーニングを実施した。縮重プライマーの配列は下記のとおりであった：

【化 1 3】

CCR 長鎖順方向(配列番号26): AGGAAT TCATGG CCTCCK CSRTSA ACTACA AY,

CCR 長鎖逆方向 (配列番号27): TCGGAT CCGCCG AAGTTS GTCTCR WABCCC CA;

CCR 短鎖順方向(配列番号28): AGGAAT TCGACA TCGACA TSGTBW TCGAG CA,

CCR 短鎖逆方向 (配列番号29) TCGGAT CCGATG ATGCGC TTSWSB KDCATC CA.

これらのプライマーを用いて、900bpおよび300bpの2つの配列をストレプトミセス属A92-309110（ストレプトミセス・フラベオルス）ゲノムから増幅した。ゲルを切り出し、PCR断片を回収し、EcoRIおよびBamHIによって消化した後、EcoRI / BamHI部位においてpSP72へとクローニングした。酵素消化および配列決定によって組換えプラスミドを同定した。全体で、互いに高度に類似の3つの異なるセットのCCR遺伝子断片をクローニングした。

【 0 1 2 1 】

（実施例2：SFA生合成遺伝子クラスターのクローニング、配列分析、および機能分析）

実施例1において先に説明したとおりクローニングされた断片をジオキシシンで標識し、ライブラリースクリーニングを実施した。結果として生じる得られた3セットのコスミドを複数群に再分割し、それらの相対的な位置を制限マッピングに従って確立した。pTL3101（cQXD03-126-6）の6.4kbのBamHI末端断片をプローブとして選択して、染色体歩行（walking）を実施し、コスミドpSL36を得た。次いでに、1.4kbのBamHI断片を選択して、染色体歩行を実施し、コスミドpTL3104（cQXD04-49-1～50）を得た。次に、遠い左側にあるBamHI断片を選択して、歩行を実施し、コスミドpTL3106（cQXD04-64-1～40）を得た。これら3回の染色体歩行の後、合計約150kbの染色体DNAをクローニングした。PKS縮重プライマーおよびNRPS縮重プライマーをそれぞれ用いて、PCRアッセイをいくつかのコスミドに関して実施し、そのうちのいくつかから特異的なバンドを増幅した。このことは、遺伝子クラスターがCCRおよびハイブリッドPKS-NRPSを含むことを確認した。

【表 4】

表1 SFA生合成遺伝子クラスターに関する配列に基づいた機能分析

遺伝子	アミノ酸	類似のタンパク質	相同タンパク質の機能	類似性／同一性
sfaU1	150	ZP_03193264	未知のタンパク質	60/45
sfaU2	112	AAW49302	リゾルベース／インテグラーゼ	81/75
sfaA	276	YP_001509705	フェニルアラニン メタ-ヒドロキシラーゼ	70/57
sfaB	446	YP_001852050	オルニチン N5-オキシゲナーゼ	73/61
sfaC	231	YP_001852059	転写調節因子	73/60
sfaD	3609	YP_631823	非リボソームペプチド シンターゼ	57/43
sfaE	2217	ABC87510	ポリケチドシンターゼ	65/52
sfaF	4206	ABB88533	ポリケチドシンターゼ	59/48
sfaG	3628	NP_824075	ポリケチドシンターゼ	63/54
sfaH	8301	ZP_03174068	ポリケチドシンターゼ	63/52
sfaI	3405	DQ_450945	ポリケチドシンターゼ	73/65
sfaJ	332	YP_112153	亜鉛結合 脱水素酵素	67/51
sfaK	1515	YP_001104567	反復性直鎖 ポリケチドシンターゼ	58/47
sfaL	425	YP_480040	アシルトランスフェラーゼ	54/42
sfaM	239	YP_949278	短鎖 脱水素酵素	60/43
sfaN	340	YP_001537010	ケトシンターゼ	66/52
sfaO	84	AAD_20269	アシルキャリアータンパク質	61/45
sfaP	616	BAB12569	アスパラギンシンターゼ 類似体	77/68
sfaQ	259	CAQ64680	チオエステラーゼ	70/58
sfaR	453	YP_002204695	クロトニルCoA 還元酵素	91/86
sfaS	71	YP_882427	MbtHタンパク質	82/67
sfaV1	178	CAD18995	未知のタンパク質	81/65
sfaV2	152	YP_002199237	仮定的タンパク質	63/53
sfaV3	144	YP_001159721	仮定的タンパク質	57/45

【0122】

最高の適用範囲を有する3つのコスミドを選択して、全長の配列決定を実施し、本発明者らは、118,372bpの連続したヌクレオチド配列を得た。バイオインフォマティクス分析は、該ヌクレオチド配列が44個のオープンリーディングフレーム（ORF）を含むことを明らかにし、そのうちの少なくとも19個のORFは、下記を含むSFA生合成と関連していることが示唆された：大環状トリペプチド主鎖（macrocyclic tripeptide backbone）の合成を生じる1個のNRPS遺伝子（sfaD）；大環状ポリケチド主鎖の合成を完了させる5個のPKS遺伝子（sfaE～I）；開始単位および各凝縮単位の合成ならびに主鎖修飾を生じる11個の推定前駆体合成遺伝子（sfaA～B、sfaJ～R）；SFA生合成の調節に関与する2個の調節遺伝子（sfaCおよびsfaS）。各遺伝子の機能分析に関する結果を、先の表に示した。

【0123】

（実施例3：SFA生合成遺伝子クラスターの境界の決定）

配列分析によると、開始点を配列決定する上流から約40kbにおいて、不完全な微量の転位があり（sfaU1およびsfaU2の上流）；終止点を配列決定する下流から約20kbにおいて、明らかに2つのトランスポゼース遺伝子（すなわち、sfaT2およびsfaT3）があるが、上流の転位遺伝子の部分は欠失している。先に境界として説明した2つの配列を用いて、すべ

てのORFは3つのセクションに分割し得る：

【 0 1 2 4 】

中間部における約120kbの配列は、先に説明したとおり、SFA主鎖生合成を生じる中心である。

上流のセクションは、SFA生合成と推定上関連していない16個の遺伝子を含み、9個の機能遺伝子（チトクロムp450モノオキシゲナーゼ遺伝子orf16、アシルキャリアータンパク質遺伝子orf14、アデニラーゼ遺伝子orf13、メチルトランスフェラーゼ遺伝子orf12、チトクロムp450ヒドロキシラーゼ遺伝子orf11、デオキシグアニンキナーゼ遺伝子orf10、脱水素酵素遺伝子orf9、およびプロテイナーゼM23S遺伝子orf6）、未知のタンパク質をコードする5個の遺伝子（orf15、orf7、orf5、sfaJ1、およびsfaJ2）、調節因子をコードする2個の遺伝子（TetRファミリーおよびLysRファミリーにそれぞれ属するorf4およびorf8）、ならびに1個のグリコシル基転移共役タンパク質遺伝子（orf3）を含む。

10

【 0 1 2 5 】

下流のセクションは、SFA生合成と推定上関連していない遺伝子を含み、未知のタンパク質をコードする3個の遺伝子（sfaV1、sfaV2、およびsfaV3）ならびに2個のトランスポゼース遺伝子（sfaT2およびsfaT3）を含む。また、TetRファミリー調節因子をコードする1個の遺伝子（orf23）、TetR共役膜タンパク質をコードする1個の遺伝子（orf24）、1個のFADモノオキシゲナーゼ遺伝子（orf25）、および1個の不完全エンドヌクレアーゼ遺伝子（orf26）もある。

【 0 1 2 6 】

20

遺伝子クラスター配列に関する予備的な分析は、本発明者らが、SFA生合成遺伝子クラスターの推定上の境界を決定するのに役立った。左側の境界は、sfaAのちょうど上流に位置し、2個の機能的に未知の遺伝子（sfaU1およびsfaU2）を含む。右側の境界は、MbtH遺伝子のちょうど下流に位置し、3個の機能的に未知の遺伝子および2個のトランスポゼース遺伝子（sfaV1～3、orf21および22）を含む。MbtHファミリータンパク質がしばしばNRPSと連結されているので、本発明者らは、MbtHファミリータンパク質が前駆体生合成の調節に関与していると推定する。しかしながら、このファミリーのタンパク質の活性は、クラスターにおけるほかのどこかの類似体によって補完することができ；いわば、全ゲノムに存在するMbtH遺伝子がすべて、ノックアウトされる必要があるうし、さもなくば、ゲノムにおける他の部位に位置するその対応物によって補完されるであろう。宿主細菌におけるMbtHの総量がわかっていないので、下流の未知のタンパク質およびトランスポゾン进行分析のために選択した。加えて、orf10の開始から82bpにおいて、35bpのプロモーター配列があり；orf18が終わる52bpにおいて、独立した終結因子配列の一部がある。全遺伝子クラスターは、先に説明したとおり、大きな転写単位に位置する。下流のトランスポゼースに関する下記の分析に基づいて、この遺伝子クラスターが、水平方向の遺伝子転移から来ることが推定される。

30

【 0 1 2 7 】

（3.1 左側の境界に関する研究）

左側の境界に関する研究は、sfaU1およびsfaU2に焦点を当てた。sfaU1は、全長453bpを有し、150個のアミノ酸残基からなる機能的に未知のタンパク質をコードし、ストレプトミセス・スピセウス（*sviceus*）における未知のタンパク質と60%の相同性を共有し；sfaU2は、全長468bpを有し、155個のアミノ酸残基からなる機能的に未知のタンパク質をコードし、分析の際に、ストレプトミセス・タージディスクビエスにおけるリゾルベース/インテグラーゼと81%の相同性を共有することがわかった。遺伝子sfaU1のノックアウトを実施して、これがSFA生合成と関連していないことを確認した。それに対し、また、sfaU1の上流および下流のトランスポゾン配列は、遺伝子クラスターの水平方向の転移の境界を意味する。

40

【 0 1 2 8 】

（3.2 右側の境界に関する研究）

右側の境界に関する研究は、sfaV1、sfaV2、sfaV3、およびsfaT2に焦点を当てた。sfaV

50

1は、全長537bpを有し、178個のアミノ酸残基からなる未知のタンパク質をコードし、ストレプトミセス・カトレヤ (*cattleya*) における未知のタンパク質と81%の相同性を共有し; sfaV2は、全長459bpを有し、152個のアミノ酸残基からなる機能的に未知のタンパク質をコードし、ストレプトミセス・コエリカラーにおける機能的に未知のタンパク質と46%の相同性を共有し、sfaV3は、全長435bpを有し、144個のアミノ酸残基からなる未知のタンパク質をコードし、ストレプトミセス・コエリカラーにおける未知のタンパク質と45%の相同性を、およびシュードモナス・シリंगाエpv. トマト (*tomato*) におけるUDP-N-アセチルグルコサミントランスフェラーゼとある相同性を共有する。sfaT2は、全長534bpを有し、177個のアミノ酸残基からなるトランスポゼースをコードし、パークホルデリア・ベトナミエンシスにおけるIS-4挿入配列と部分的に相同である。トランスポゾン配列の分析に基づいて、下流の境界は、トランスポゾン領域に隣接して位置することが決定された。

10

【0129】

(実施例4: SFA開始単位の生合成についての提唱)

内在性アセトアセチルCoAは、sfaMによってコードされる短鎖脱水素酵素/還元酵素によってヒドロキシ-ブチリルCoAに還元された後、未知の一次代謝性デヒドラターゼによってクロトニルCoAに還元される。次に、クロトニルCoAは、sfaRによってコードされるクロトニルCoA還元酵素によって還元的にカルボキシル化され、sfaPによってコードされるアスパラギンシンテターゼ類似体によってアミド化される。その後、次に生じる2つの炭素単位の組み込みによる伸長が、(sfaE-ACP1によってコードされる) 開始アシルキャリアータンパク質の自己アシル化を介して完了する。その間、修飾された機能を有しかつsfaLによってコードされる遊離アシルトランスフェラーゼは、自己アシル化によって誤って付加された他の単位を加水分解する原因であると考えられる。

20

【0130】

(実施例5: SFAにおけるm-チロシンの生合成についての提唱)

旧来のフェニルアラニン/チロシン/トリプトファンヒドロキシル化系はすべて、芳香系の電子豊富な領域においてヒドロキシル化を実現させるための求電子置換反応に頼っている。対照的に、フェニルアラニンのメタ-ヒドロキシル化は、フェニルアラニンの比較的電子の少ないメタ位において生じる。NRPSにおける第二のアデニル化ドメイン(A2)に関するバイオインフォマティクス分析は、該ドメインの活性型フィンガープリント領域が、他の系におけるフェニルアラニンを認識することの原因であるアデニル化ドメインのフィンガープリント領域と何ら相同性を共有せず、チロシンとの明白な会合を有さないことを示している。推定メタ-ヒドロキシラーゼSfaAは、大腸菌において発現し、標準的な方法を用いて単離された。AMP PPIアッセイ(方法についてはGarneauらの文献(2005)参照)におけるこのタンパク質に関するインピットロでの研究は、遊離フェニルアラニンに関して該タンパク質が何ら活性を有さないが、アセチルシステアミン(SNAC)チオエステル誘導体に対して活性を示すことを示した。このことは、フェニルアラニンが、ポリペプチド主鎖への組み込みに対する至適基質であること、すなわち、組み込み後にインシトゥでの修飾が、メタ-チロシン単位を得るために生じることを示唆している。

30

【0131】

(実施例6: SFAピペラジン酸単位の生合成についての提唱)

SFA構造における短鎖ペプチド部分の第三の構築ブロックは、ピペラジン酸単位であり、ピペラジン酸単位は、2,3-位置選択的様式でペプチド主鎖の組み込みに関与する。ピペラジン酸単位はまず、環を形成するための1,2位における脱水素、アンモノリシス、N⁵酸化、次いで還元を介してプロリン前駆体から得られると推定された。しかしながら、先行の標識アッセイは、ピペラジン酸単位の実際の前駆体がグルタミン酸であることを示している(Umazawaらの文献(2001)、Millerらの文献(2007))。それゆえ、ピペラジン酸単位が水素付加および脱水、N⁵酸化、次いで水素付加を介して前駆体分子グルタミン酸/グルタミンから形成されることが示唆される。オルニチンが前駆体であるという直接的な証拠は、他の標識アッセイ系において何ら得られていないが、本発明者らは、他の系にお

40

50

いてみられるように、オルニチンが、環を形成するための直接的なN⁵の酸化によって、該標識アッセイ系におけるピペラジン酸形成に関与することが可能であると考えている（Fujimoriらの文献（2007））。

【0132】

（実施例7：通常ではない伸長単位の生合成についての提唱）

sfaKによってコードされる反復性ポリケチドシンターゼは、6炭素の通常でない伸長単位の生合成に関与していると考えられる。アセチルCoAまたはマロニルCoAは、2回の2炭素伸長を経るための開始単位として用いられ、トリケトヘキサノイルCoAが得られる。次に、中央部におけるケト基が、該酵素の末端における通常ではない酸化-還元ドメインによって選択的に還元され、共役二重結合を有する部分的に還元したCoA誘導体が得られる。次に、sfaRによってコードされるクロトニルCoA還元酵素による還元的カルボキシル化を介して、ポリケチド鎖伸長のプロセスに組み込まれるよう、該CoA誘導体が活性化される。sfaKのノックアウト突然変異体に由来する発酵産物の同定において、本発明者らは、m/z 1033.4のシグナルを検出した（図6C）。このことは、代償的な生合成産物の推定上の発生を支持しており、すなわち、特別な伸長単位側鎖が、PKSにおけるトランスアシル化に対応するドメインの点で非至適である基質メチルマロニルCoAによって置換され、それによりメチル側鎖を有する置換産物が得られる。

【0133】

（実施例8：遺伝子手段によるSFAの非天然類似体の作製）

SFA生合成遺伝子クラスターにおける種々のDHドメインに対応するセグメントは、位置指定突然変異誘発によって失活し、それにより、活性部位残基を欠失するデヒドラターゼをコードする。このデヒドラターゼを用いて中間体産物に作用し、該中間体産物は、上流のAT認識、ACPへの転移、KSによって触媒される縮合、KRによる還元を受けた。該デヒドラターゼは、二重結合を形成するためのその脱水機能を発揮できないので、それゆえ、ヒドロキシ基を有するSFA類似体を得られる。デヒドラターゼドメイン（DH）は、ケト還元由来するヒドロキシ基の脱水を触媒して二重結合を形成する酵素ドメインである。機能ドメインは、高度に保存されたモチーフLXXHXXGXXXXPを有し、ここで、ヒスチジン残基は、触媒活性中心であり；ロイシンおよびグリシンは、正常な折りたたみを維持し；プロリンは、時折保存されておらず、かつ機能的に未知である。従って、ヒスチジン残基は、突然変異のための標的として選択された。SfaA4（sfaH）におけるDH3 / DH4 / DH5 / DH6（モジュール7、8、10、および11のDHドメイン）（それぞれマクロライドのエステル基の内外の2つの二重結合2セットの形成の原因である。）は、位置指定突然変異誘発によって失活すべき標的機能ドメインとして選択された。ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を用いて、先の機能ドメインのモチーフに隣接するほぼ1kbの8個のDNA断片を増幅し、これらの断片を相同的アームとして用いた。ヒスチジン残基をグリシン / アラニンまたはそれらの類似物の非極性アミノ酸残基に変化させて、脱水機能を除去した。変化したコドンプライマーによって導入し、突然変異を有する2つの断片を連結した（このような連結に必要とされる制限部位は、サイレント突然変異によって導入されてもよい。）。この様式で、位置指定突然変異誘発に必要な相同的組換えプラスミドを構築した。対応する突然変異株を発酵させた。液体クロマトグラフィー / 質量分析は、M+18シグナルピークを検出し（LC-ESI-MS m/z 1109.3、1131.5）、所望の化合物が産生されることを示した。

本発明に関する理解を容易にするために、下記に実施例をさらに提供し、これは、説明目的のためのみであり、本発明の範囲を制限するものではない。

【0134】

（実施例9：SFA産生株ストレプトミセス属A92-309110（ストレプトミセス・フラベオルスのための遺伝子転移系の構築））

接合転移において用いられる標的プラスミドをまず、大腸菌S17-1において形質転換した。プレートから単一コロニーを拾い、3mLのLB培地および選択負荷のための対応する抗生物質を有するチューブに接種し、37℃で一晩インキュベートした。培養物を翌日回収し、1mLの培養物をピペティングし、50mLのLB培地および選択負荷のための対応する抗生

物質を含む250mL振盪フラスコに接種した。OD₆₀₀値がほぼ0.5に到達するまで、インキュベーションを振盪機において37℃で実施した。培養物を50mLのエピENDORフチューブに移し、16℃、3800rpmで10分間遠心分離した。細菌を回収し、20mLのLB培地で2回洗浄した後、同一の条件下で遠心分離した。次に、細菌を回収し、使用前に1mLのLBにおいて再懸濁した。凍結保存した1本のチューブの孢子懸濁液を取り、室温、12000rpmで3分間遠心分離した。上清を除去した後、1mLのTES緩衝液で2回洗浄し、500μLのTES緩衝液において再懸濁した。熱ショックを50℃の水槽において10分間実施した後、500μLのTSB培地を添加した。溶液を十分に混合し、37℃で4～5時間インキュベートした後、遠心分離して上清を完全に除去した。次に、使用前に、ペレットを1.5mLのLBで再懸濁した。

【0135】

10

レシピエント細菌およびドナー細菌（各100μL）を、MS培地（10mM MgCl₂含有）を有するプレートに延展し、30℃で12～16時間培養した。加えて、レシピエント細菌のみを延展した1枚のプレートをネガティブコントロールとして用いた。培養後、4～5mLの二重滅菌H₂Oを各プレートに添加し、表面を掻爬機で穏やかに掻爬した。水を吸収させた後、プレートを1時間乾燥させ、次に、1mLの二重滅菌H₂O（12.5μg/mLのアブラマイシン（Am）および50μg/mLのナリジクス酸（NA）含有）で被覆し、30℃で3～5日間培養した。

【0136】

うまく形質転換した十分に増殖した単一のコロニーを拾い、必要であれば抗生物質選択を含む3mLのTSB培地に接種した。培養物を30℃で振盪した。1日後、ほぼ1μLの培養物を取り出し、AmR ISP-4を含む150mmプレートに延展した後、37℃で2日間培養した。プレートを、カナマイシンISP-4を含む固体プレート培地と直接重ね、37℃で6～7時間培養した。次に、2ピースの培地を分離し、それぞれ37℃でさらに2日間培養した。AmRにおいて増殖したがカナマイシンプレートにおける対応する位置で増殖しなかった単一のコロニーを拾い、3mLのTSB培地に接種した。培養物を振盪し、発酵のために準備した。

20

【0137】

（実施例10：SFA産生株ストレプトミセス属A92-309110（ストレプトミセス・フラベオルス）の遺伝子ライブラリーの構築）

（10.1 小規模酵素消化アッセイ）

まず、使用するSau3AIの量を、一連の希釈実験によって決定した。250μL（40μLのゲノムDNA（例えば（gDNAQXD01-82-1）、2.5μLのBSA（100×）含有）の反応系をまず調製し、次に、250μLの反応系を1×50μLおよび7×25μLに分割し、氷上で維持した。次に、すでに0.5μL/μLに希釈しておいた2μLのSau3AIを、50μLの反応系を含むチューブ#1に添加し、十分に混合した。次に、25μLをチューブ#2の25μLに転移した。これらの転移工程を7回反復した。すべての系を37℃の水槽において15分間インキュベートした後、70℃で10分間失活させた。0.4%アガロースゲル電気泳動を冷温室において4℃で実施した後、臭化エチジウムで染色した。酵素消化の質を、紫外線光の下でまたはゲル撮像システムを用いて検討した。

30

【0138】

（10.2 大規模酵素消化アッセイ）

予備実験において決定した反応条件に従って、対応する濃度における4倍量の全DNAおよび酵素を用いて、ライブラリーを構築するのに必要なDNA断片を調製した：本系を氷上で十分に混合し、5個の一定分量に均等に分割し、37℃の水槽においてインキュベートした。12、14、16、18、および20分でそれぞれ、一定分量を取り出し、70℃で10分間失活させた。0.4%アガロースゲル電気泳動を冷温室において4℃で実施した後、臭化エチジウムで染色した。酵素消化の質を紫外線光の下でまたはゲル撮像システムを用いて検討した。

40

【0139】

（10.3 脱リン酸化）

適切な大きさの消化したDNA断片を飽和フェノールおよびクロロホルム-イソアミルアルコール溶液で連続的に抽出した。0.1容積の3M NaAcおよび3容積の無水アルコールを添加して、DNAを沈殿させた。次に、DNAペレットを70%アルコールで洗浄し、乾燥させた後、

50

200 μL の水において再懸濁した。10 μL を対照として取り出し、残りのDNAを脱リン酸化した。10 μL のSAP (Promega、1単位/ μL) および25 μL の10 \times 緩衝液を190 μL のSau3AI消化DNAに添加した後、水を添加して250 μL にした。本系を37 $^{\circ}\text{C}$ で1時間インキュベートし、7 μL のSAPを補充した後、十分に混合した。1時間のインキュベーションの後、熱変性を70 $^{\circ}\text{C}$ で実施して酵素を失活させた。飽和フェノール、クロロホルム：イソアミルアルコール溶液で抽出を連続的に実施した。0.1容積の3M NaAcおよび3容積の無水アルコールを添加して、DNAを沈殿させた。次に、DNAを70%アルコールで洗浄し、乾燥させ、15 μL のTE溶液において再懸濁した。次に、脱リン酸化が完了しているかどうかをみるために、DNAを検査した。0.3%アガロースゲル電気泳動を冷温室において4 $^{\circ}\text{C}$ で実施し、ゲルを臭化エチジウムで染色した。酵素消化の質を紫外線光の下でまたはゲル撮像システムを用いて検討した。

10

【0140】

(10.4 SuperCos1ベクターの調製)

単一の酵素XbaIを用いて、2つのcos部位の間でSuperCos1を直鎖状にした後、脱リン酸化を実施した(自己連結を防止するため)。次に、ゲノムDNAの部分的に消化した断片を挿入するために、BamHIを用いて消化を実施して、1kbおよび7kbの2つのアームを得た。調製したベクターは、1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ の濃度を有していた。

【0141】

(10.5 全DNAに由来する断片のSuperCos1ベクターへの連結)

6 μL の脱リン酸化したDNA(ほぼ2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) および4 μL の調製したSuperCos1((ほぼ1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$))を混合し、1.2 μL を対照として取り出した。残りの8.8 μL の混合物溶液に、1.2 μL のT4 DNAリガーゼ(NEB 400 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) および1.2 μL の緩衝液を添加した後、十分に混合した。連結を16 $^{\circ}\text{C}$ で16時間実施した。アガロースゲル電気泳動を冷温室において4 $^{\circ}\text{C}$ で実施した。ゲルを臭化エチジウムで染色し、紫外線光の下でまたはゲル撮像システムを用いて検討した。

20

【0142】

(10.6 ライブラリーパッケージング)

1つのStratagene Gig Pack III XLパッケージング試薬を-80 $^{\circ}\text{C}$ の冷凍庫から取り出し、手で迅速に解凍した。4 μL の連結産物を添加し、穏やかに3回ピペティングした。混合物を22 $^{\circ}\text{C}$ の水槽において2時間インキュベートした後、取り出し、500 μL のSM緩衝液を添加した後、数回転倒混和した。50 μL のクロロホルムを添加し、混合物を数回転倒混和した(ここで、いくらかのタンパク質様沈殿が見えるだろう。)次に、混合物を数秒間遠心分離した。上清をピペティングによって転移させ、4 $^{\circ}\text{C}$ で保存した。

30

【0143】

(10.7 用量設定)

まず、大腸菌VCS257の単一の細菌コロニーをプレートから拾い、LBに接種して一晚培養した。500 μL の培養物を取り、50mLのLB(10mM MgSO_4 、0.2%マルトース)に接種し、37 $^{\circ}\text{C}$ で振盪しながら培養した。大腸菌の OD_{600} が0.84に到達したとき、5 μL のパッケージング溶液を45 μL のSM緩衝液に添加した後、50 μL の大腸菌VCS257に添加した。チューブを穏やかに軽くたたいて混合した後、22 $^{\circ}\text{C}$ の水槽中へと置いて、30分間インキュベートした。400 μL のLBを添加し、チューブを数回転倒混和した後、37 $^{\circ}\text{C}$ の水槽において75分間インキュベートした(および、15分ごとに数回転倒混和した。)。250 μL を各LBプレート(アンピシリン(Amp) 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)に延展し、37 $^{\circ}\text{C}$ で一晩インキュベートした。

40

【0144】

(10.8 ライブラリーの真正性の確認)

増殖した細菌コロニーが、偽陽性ではなく、実際に組換えコスミドを含んでいることを立証するために、10個のコロニーを無作為に拾い、LB(アンピシリン100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)に接種し、培養した。大腸菌プラスミドDNAミニプレップに用いたアルカリ溶解法に従って、コスミドを抽出した後、BamHIで消化し、0.5%アガロースゲルにおいて泳動した。

【0145】

50

(10.9 ライブラリーの増幅)

大腸菌VCS257を50mLのLB (10mM MgSO₄、0.2%マルトース含有) に接種し、OD₆₀₀ = 0.84まで培養した後、トランスフェクションを即時実施した。細胞培養物 (100 μL) およびパッケージング溶液 (100 μL) を穏やかに混合し、22 の水槽において30分間インキュベートした後、800 μLのLBを5個の微量遠心管の各々に加え、穏やかに混合し、37 の水槽において15分ごとに穏やかに混合しながら、75分間インキュベートした。インキュベーションを実施している間、5個の大皿 (100 μg/mLのアンプシリン濃度) を恒温器に37 で配置して、あらかじめ加温した。水槽におけるインキュベーションが終了した後、プレートに、各プレートにつき1つの微量遠心管の内容物を延展し、37 で一晩インキュベートした。18時間培養した後 (細菌コロニーが十分増殖するまで)、3~4mLのLBを各プレートに添加した。細菌コロニーを搔爬機で搔爬し、培養溶液をピペティングし、50mLの遠心管に転移した。5個の大皿由来の培養溶液をプールし、アンプシリンおよび滅菌グリセロールを添加して、50 μg/mLおよび18% (v/v) の終濃度にした。250 μL / 管の一定分量を -80 で保存した。

10

【0146】

(実施例11: PCRターゲッティングによるsfaK遺伝子の遺伝子置換を結果的に生じる遺伝子操作されたストレプトミセス属A92-309110 (ストレプトミセス・フラベオルス) の作出)

PCRターゲッティングによるサングリフェリン生合成クラスターのsfaK遺伝子におけるフレーム内欠失を用いて遺伝子操作されたストレプトミセス属A92-309110 (ストレプトミセス・フラベオルス) の作出は、PCRターゲッティングの標準的な手順を用いて、アブラマイシン耐性マーカーおよびoriTによって置換されているsfaKコード領域の大部分を包含する (Gustらの文献 (2002))。

20

【0147】

PCRターゲッティング手順に従ってプライマー201-1L (配列番号30の配列) および201-1R (配列番号31の配列) を設計して、テンプレートpIJ773 (GenBank受託番号AX657066.1) からoriTとともにアブラマイシン耐性マーカーを増幅した。各プライマーの5'領域 (非下線部) は、FRT、oriT、aac(3)IV、およびFRTを含むpIJ773由来の置換カセットを有するオリゴの結合領域間のsfaK配列の置換がSfaKの活性を除去するであろうように、sfaKと同一である。各オリゴの下線部の3'領域は、置換カセットの増幅のためのpIJ773における配列と同一である。置換カセット内で、FRTは、FLP-リコンビナーゼ認識標的配列であり、2つのFRT配列は、RK2 (oriT) およびアブラマイシン耐性遺伝子 (aac(3)IV) からの転移の起源に隣接しており、当業者は、この技術に精通しているであろうし、Gustらの文献 (2002) において詳細に説明されており、引用によりさらに支持されている。

30

【化14】

201-1L (配列番号30):

5'-CTCGACCGGTACTGGGCCAACGTGGTGGCCGGTGTCTGACATTCCGGGGATCCGTC
GACC-3'

40

201-1R (配列番号31):

5'-GGCCAGTTCGCGCAGGAAGGCCCGTACGCCGTCTCCGGTGTAGGCTGGAGCTGC
TTC-3'

【0148】

最大1.4kbのPCRターゲッティングDNAカセットの増幅は、プライマー201-1L (配列番号26の配列) およびプライマー201-1R (配列番号27の配列)、テンプレートとしてのpIJ773、およびPrimer Star Polymerase (Takara Co. Ltd.) を用いて、50 のアニーリング温度をとる標準的な条件を用いて達成された。コスミドpTL3102は、サングリフェリン

50

クラスターの適切な領域をカバーし、まず、大腸菌BW25113/pIJ790へと形質転換して、大腸菌株BW25113/pIJ790/3102を与えた。大腸菌BW25113/pIJ790を30℃で、クロラムフェニコール(25 µg/mL)を含むLB(ルリア・ベルターニ培地; Sambrookらの文献(1998))において維持した。遺伝子置換コンストラクトpTL3122を作製するために、以下に概略される工程を実施した。ゲル精製したDNAカセットを大腸菌BW25113/3102へと電気穿孔によって形質転換することによって、PCRターゲッティングを果たし、電気穿孔後、細菌を37℃のLBにおいて1時間インキュベートして組換えを誘導し、抗生物質耐性株(antibiotic resistance)を発現させて、次に100 µg/mLアブラマイシンを含むLBアガーに蒔種し、同じ温度で一晩インキュベートした。アブラマイシン耐性コロニーを、100 µg/mLアブラマイシンを補充したLBに接種し、37℃で一晩インキュベートした。コスミドDNAを単離し、耐性カセットの存在を制限酵素消化およびDNA配列分析によって確認し、生成したコスミドをpTL3111と名付けた。ストレプトミセスへの形質転換を容易にするために、コスミドの大きさを、pTL3111をBglIIで切断することによって減少させた。失活したsfaKおよびacc(3)IV含有耐性カセットを含む13kbのBglII断片をpKC5201へとサブクローニングして、最終的な置換コンストラクトpTK3122を与えた。pKC5201は、acc(3)IVをsupercos1のネオマイシン耐性遺伝子と置換することによって、pKC1139から派生した。ストレプトミセス属A92-309110(ストレプトミセス・フラベオルス)におけるsfaK置換突然変異株を作出するために、pTL3122を大腸菌S17-1へと電気穿孔によって形質転換して、接合のための大腸菌ドナー株を作出した。ストレプトミセス属A92-309110(ストレプトミセス・フラベオルス)を、先の一般的な方法に記載したとおり、大腸菌S17-1/pTL3122との接合によって形質転換した。アブラマイシン耐性産出接合体(ex-conjugant)をホモジナイズし、50 µg/mLアブラマイシンを補充したISP-4アガーへと画線し、十分に増殖したコロニーに達するまで37℃で培養した。一連の単一のクローンを、30 µL/mLのアブラマイシンを補充した3mLのTSBプラスに接種し、37℃、250rpmで4日間振盪した。100 µLの各培養物をISP-4アガーに延展し、37℃で2~3日間インキュベートして、第二のクロスオーバー事象を誘導した。単一のコロニーをネオマイシンの有無の下で蒔種し、プラスミド骨格の損失を決定した。ネオマイシン選択性は、プラスミド配列の損失を示し、該表現型を有するコロニーをPCRによって分析して、DNAカセットを有するsfaKの置換が達成されたことを確認した。このような1つのコロニーをストレプトミセス・フラベオルスmv.クウェンゲンシスと命名し、別名ストレプトミセス属TL3011であった。次に、記載した方法に従って株を培養し、該株はサングリフェリンXを産生することがわかった(図6C参照)。

【0149】

(実施例12: PCRターゲッティングによる一連のサングリフェリン生合成遺伝子の遺伝子置換を結果として生じる遺伝子操作されたストレプトミセス属A92-309110(ストレプトミセス・フラベオルス)株の作出)

先の実施例11において説明したものと類似の方法を用いて、sfaA、sfaB、sfaC、sfaJ、sfaL、sfaM、sfaN、およびsfaPの置換突然変異体を構築した。各場合において、標的遺伝子のコード領域の大部分を、PCRターゲッティングの標準的な手順を用いて、アブラマイシン耐性マーカーおよびoriTによって置換した(Gustらの文献(2002))。一対のプライマーを、PCRターゲッティングの手順に従って、各標的遺伝子(表2)について設計して、アブラマイシン耐性マーカーをoriTとともにテンプレートpIJ773(GenBank受託番号AX65706.1)から増幅した。各プライマーの5'領域(非下線部)は、オリゴの結合領域間の遺伝子配列の、FRT、oriT、aac(3)IV、およびFRTを含むpIJ773由来の置換カセットとの置換が、標的遺伝子によってコードされる活性を除去するであろうように、該遺伝子と同一である。各オリゴの下線部の3'領域は、置換カセットの増幅のためのpIJ773における配列と同一である。置換カセット内で、FRTは、FLP-リコンビナーゼ認識標的配列であり、2つのFRT配列は、RK2(oriT)およびアブラマイシン耐性遺伝子(aac(3)IV)からの転移の起源と隣接しており、当業者は、この技術に精通しているであろうし、該技術は、Gustらの文献(2002)において詳細に説明されており、引用によりさらに支持される。

最大1.4kbのPCRターゲッティングのDNAカセットの増幅は、表2に示されるプライマー、

テンプレートとしてのpIJ773、およびPrimer Star Polymerase (Takara Co. Ltd.) を用いて、標準的な条件を用いて達成された。

【表 5】

表2 PCRターゲティングに用いたプライマー

プライマー		プライマー配列	標的遺伝子
201-2L	配列番号 32	GTGGAATCGGCTCGGGCGCGCCC GAATTAACCGCGTCGATTCCGGGGA TCCGTCGACC	<i>sfaA</i>
201-2R	配列番号 33	AATGGATGTATCGTCGCAGGACGCC CAGAATTCACCTGCTGTAGGCTGGA GCTGCTTC	
201-3L	配列番号 34	GCGCAGCAGAGCCCCGAATCAGAA GTACTGGACGTCACCATTCGGGGA TCCGTCGACC	<i>sfaB</i>
201-3R	配列番号 35	GGCGATCTCGCCCGCGCGGACCGC CACCATGGACAGCAGTGTAGGCTGG AGCTGCTTC	
201-4L	配列番号 36	GAGGATTGCGACGGCGTCGTCCTG GCGTTTCTGCGACACATTCCGGGGA TCCGTCGACC	<i>sfaC</i>
201-4R	配列番号 37	CTCCTCGTCGGCTTCGGTGAGTCCG CGGTCGCGCATCACTGTAGGCTGGA GCTGCTTC	
201-5L	配列番号 38	GGCCCGCAGGACAGGTCCGGCGGC CCGGTGCGCGGCGAGATTCCGGGG ATCCGTCGACC	<i>sfaJ</i>
201-5R	配列番号 39	CGCGCCGGAGAACAGCGGGAAGTA GGTGTGAGGTGCTGTGTAGGCTGG AGCTGCTTC	
201-6L	配列番号 40	GGCCGCCCCCGAGCCCTGGGCGC CGCCCTGCGTTCTGGGATTCCGGGGA TCCGTCGACC	<i>sfaL</i>
201-6R	配列番号 41	GCTCTCCACGGAGGCGCTCACCGC GGCGACGGCGGCCTCTGTAGGCTG GAGCTGCTTC	
201-7L	配列番号 42	GCGGTCGTGACCGGATCGTCCCGC GGCATCGGCGCGGCCATTCCGGGG ATCCGTCGACC	<i>sfaM</i>
201-7R	配列番号 43	CACGCCGTCGGCGGTCCAGCCGCC GTCGAAGCGCAGGGTGTGTAGGCTG GAGCTGCTTC	
201-8L	配列番号 44	CTTCGGCGTCCTCGCGCTCGCCAC GCCCTCGGCGATCCATTCCGGGGAT CCGTCGACC	<i>sfaN</i>
201-8R	配列番号 45	GTGCATGCCGATGGACAGGCCCGC GAGCGCGACCACGCTGTGTAGGCTG GAGCTGCTTC	
201-9L	配列番号 46	GACGACCTCGCGCGGCACCGGTCC GTCGTCCAGGCGATGATTCCGGGGA TCCGTCGACC	<i>sfaP</i>
201-9R	配列番号 47	CATCTCGATGCCGCCCCGGTCGTGC GGCAGGCTGAAGTCTGTAGGCTGGA GCTGCTTC	

【 0 1 5 0 】

遺伝子置換コンストラクトを作製するために、ゲル精製したカセット断片を大腸菌Bw25 113 / pIJ790 / 3106 (*sfaA*、*sfaB*、および*sfaC*については表3に示すとおりである。) また

10

20

30

40

50

は大腸菌Bw25113 / 3102 (*sfaJ*、*sfaL*、*sfaM*、*sfaN*、および*sfaP*については表3に示すとおりである。) に電気穿孔によって形質転換することによって、PCRターゲティングを実施する。該株は、コスミドpTL3106またはpTL3102を大腸菌Bw25113 / pIJ709に電気穿孔によって形質転換することによって、前もって作出される。形質転換後、細菌を37 °CのLBにおいて1時間インキュベートして、組換えを誘導し、抗生物質耐性株を発現させ、次に、100 µg/mLのアンプラマイシン (ampramycin) を含むLBアガーに蒔種し、37 °Cで一晩インキュベートした。アンプラマイシン耐性コロニーを、100 µg/mLアンプラマイシンを補充したLBに接種し、37 °Cで一晩インキュベートした。組換えコスミドを、プラスミド単離キット (Dingguo Co.Ltd.) によって単離し、制限酵素消化およびDNA配列によって確認した後、表3に示す名称を与えた。より大きなコスミドDNAがレシピエントのストレプトミセス属に形質転換する効率が低いことにより、接合による組換えコスミドのストレプトミセスへの直接的な形質転換は、pTL3113およびpTL3114についてのみ成功し、該pTL3113およびpTL3114は、*sfaB*および*sfaC*の失活のためのカセットを含んでおり、それぞれ突然変異株TL3003およびTL3004を結果として生じた。残りについては、表3に示す制限酵素を用いて組換えコスミドを切断することによって、インサートの大きさを短くした。結果として生じるDNA断片を、*acc(3) IV*をsupercos1のネオマイシン耐性遺伝子と置換することによってpKC1139から派生したpKC5201へとサブクローニングして、表3に示すプラスミドを与えた。これらのプラスミドは結果的に、所望の突然変異の組み込みを生じ、突然変異株は、表3に示す命名された名称を与えられ；それによりストレプトミセス属TL3002株は、*acc(3) IV*含有耐性カセットによって置換された*sfaA*を有しており、ストレプトミセス属TL3005は、*acc(3) IV*含有耐性カセットによって置換された*sfaJ*を有しており、ストレプトミセス属TL3006は、*acc(3) IV*含有耐性カセットによって置換された*sfaL*を有しており、ストレプトミセス属TL3007は、*acc(3) IV*含有耐性カセットによって置換された*sfaM*を有しており、ストレプトミセス属TL3008は、*acc(3) IV*含有耐性カセットによって置換された*sfaN*を有しており、ストレプトミセス属TL3009は、*acc(3) IV*含有耐性カセットによって置換された*sfaP*を有している。

【表 6】

表3 組換えコスミドおよびプラスミド

生成した突然変異体	標的遺伝子	コスミド	組換えコスミド	大きさを短くする酵素	消化後の断片の大きさ (kb)	プラスミド名
TL3002	<i>sfaA</i>	pTL3106	pTL3112	<i>BglII</i>	8	pTL3123
TL3003	<i>sfaB</i>	pTL3106	pTL3113	N.A.	N.A.	N.A.
TL3004	<i>sfaC</i>	pTL3106	pTL3114	N.A.	N.A.	N.A.
TL3005	<i>sfaJ</i>	pTL3102	pTL3115	<i>BglII/EcoRI</i>	11	pTL3124
TL3006	<i>sfaL</i>	pTL3102	pTL3116	<i>EcoRI</i>	10	pTL3125
TL3007	<i>sfaM</i>	pTL3102	pTL3117	<i>EcoRI</i>	11	pTL3126
TL3008	<i>sfaN</i>	pTL3102	pTL3118	<i>EcoRI</i>	10.5	pTL3127
TL3009	<i>sfaP</i>	pTL3102	pTL3119	<i>EcoRI</i>	9.5	pTL3128

【 0 1 5 1 】

ストレプトミセスの形質転換のためのプラスミドまたはコスミドをまず、大腸菌s17-1へと形質転換し、次に先の実施例9に説明したとおり、ストレプトミセスへと接合する。アパラマイシン (aparamycin) 耐性接合体をホモジナイズし、50 µg/mLアンプラマイシンを補充したISP-4アガー培地に画線し、37 °Cで、十分に増殖したコロニーに達するまで培養した。各々の一連の単一のクローンを用いて、アンプラマイシン30 µg/mLを補充した3mLのTSBブロスに37 °C、250rpmで振盪しながら4日間接種した。100 µLの培養物を37 °CのISP-

4アガーに2～3日間延展して、第二のクロスオーバー事象を誘導した。単一のコロニーをネオマイシンの有無の下で蒔種し、プラスミド骨格の損失を決定した。ネオマイシン選択性は、プラスミド配列の損失を示し、その表現型を有するコロニーをPCRによって分析して、標的遺伝子とDNAカセットとの置換が達成されたことを確認した。最終的な突然変異株に、表3に示す株の名称を与えた。

【0152】

(実施例13：sfaRの遺伝子欠失を結果として生じる遺伝子操作されたストレプトミセス属A92-309110(ストレプトミセス・フラベオルス)株の作出)

コスミドpTL3102をBglIIIおよびKpnIで消化した。結果として生じる4.7kbpのDNA断片を、BglIII/KpnIで消化したpSP72にクローニングして、pTL3132を作製した。pTL3132の内部674bpDNA断片をEco72I消化によって除去し、ベクターを自己連結して、pTL3133を作製した。pTL3133のBglIIIおよびHindIII断片をBamHI/HindIIIで消化したpKC1139へとクローニングして、pTL3129を作製し、これを用いて、sfaRの遺伝子欠失を操作した。

【0153】

所望の二重組換え株の作出を、先に説明したものと類似の手順を用いて実施した。大腸菌S17-1/pTL3129を用いて、ストレプトミセス属A92-309110(ストレプトミセス・フラベオルス)を接合により形質転換した。アブラマイシン耐性接合体をホモジナイズし、50μg/mLアブラマイシンを補充したISP-4アガー培地に画線し、37℃で、十分に増殖したコロニーに達するまで培養した。各々の一連の単一のクローンを、アブラマイシン30μg/mLを補充した3mLのTSBプラスに接種し、37℃、250rpmで4日間振盪した。100μLの培養物をISP-4アガーに37℃で2～3日間延展して、第二のクロスオーバー事象を誘導した。37℃において二重クロスオーバー組換えを誘導した後、PCRによる遺伝子型の立体配座のために、負のアブラマイシン表現型を有するコロニーを拾い出す。所望のPCR産物は、1.4kbpの野生型パターンとは異なる約700bpである。sfaRを欠失している最終的な株をストレプトミセス属TL3010と命名した。

【0154】

(実施例14：sfaHの4個のDHドメインの各々におけるDH突然変異体の生成)

sfaHの4個のDHドメインは、PKSモジュール7、8、10、および11内に含まれている。先の特許文書において説明したとおり、DHドメインの活性は、位置指定突然変異誘発によって除去され、活性部位のヒスチジンを非極性アミノ酸に変化させることができる。これを、モジュール7、8、10、および11の4個のDHドメインについて、以下の表4に概略したプライマーを用いて各DHについて2つのアームを増幅することによって実施した。

【表 7】

表 4:

	プライマー	配列番号	配列
DH(モジュール 7) 左側のアーム	105A-2	配列番号 48	TTT <u>GGATCCT</u> ACACCGGCCA GGGCGCCC
	105C-2	配列番号 49	TTT <u>GGTACCG</u> AGGACGCTAG CGTCGGCCAGCCAGGGGTG C
DH (モジュール 7) 右側のアーム	105B-2	配列番号 50	TTT <u>AAGCTT</u> AGCACCCGTGC CACCGGTCAC
	105D-2	配列番号 51	GCTAGCGTCCTC <u>GGTACCCC</u> GGTGCTCCCCGGCACC
DH (モジュール 8) 左側のアーム	106A-2	配列番号 52	TTT <u>GGATCC</u> GGTGTGTGGG CGGTGATGG
	106C-2	配列番号 53	TTT <u>GAATTCGGCG</u> AGTACTA CGGCATCGGCCGTCCAGGC GGC
DH (モジュール 8) 右側のアーム	106B-2	配列番号 54	TTT <u>AAGCTT</u> GCACGACGTGG CCGAAGCG
	106D-2	配列番号 55	TTT <u>GAATTCGCCG</u> TAGTACTC GCCACCACCCTGCTGCCCCG GC
DHモジュール 10 左側のアーム	107A	配列番号 56	TTT <u>GAATTC</u> GGGTGGTCCGG AGCTGGATCG
	107C	配列番号 57	CGGCAGCAGGGCAGGG <u>ACT</u> <u>AGT</u> ATGGCGGC
DH (モジュール 10) 右側のアーム	107B	配列番号 58	TTT <u>AAGCTT</u> GGTGCTCGGAC TGGGCGGAGC
	107D	配列番号 59	GCCGCCAT <u>ACTAGT</u> CCCTGC CCTGCTGCCG
DH (モジュール 11) 左側のアーム	108A	配列番号 60	TTT <u>GAATTC</u> GACGACACCG GATACGGGC
	108C	配列番号 61	CGGCAGCAGGACGGTG <u>ACT</u> <u>AGT</u> ACGGTGGC
DH (モジュール 11) 右側のアーム	108B	配列番号 62	TTT <u>AAGCTT</u> CCACCCATGTCT GCACCAGG
	108D	配列番号 63	GCCACCGT <u>ACTAGT</u> CACCGT

10

20

30

40

【 0 1 5 5 】

それゆえ、適切な配列を生成してモジュール7のDHを突然変異させるために、左側のアームをプライマー105A-2および105C-2を用いて増幅し、結果として生じる1.2kbpのDNA断

50

片をpANT841へとクローニングして、01-44-1を与え、右側のアームをプライマー105B-2および105D-2を用いて増幅し、結果として生じる1.2kbpのDNA断片をpANT841 (Genbank : AF438749) へとクローニングして、01-44-2を与えた。

【 0 1 5 6 】

適切な配列を生成してモジュール8のDHを突然変異させるために、左側のアームをプライマー106A-2および106C-2を用いて増幅し、結果として生じる1kbpのDNA断片をpANT841へとクローニングして、01-44-3を与え、右側のアームをプライマー106B-2および106D-2を用いて増幅し、結果として生じる1kbpのDNA断片をpANT841へとクローニングして、01-44-4を与えた。

【 0 1 5 7 】

適切な配列を生成してモジュール10のDHを突然変異させるために、左側のアームをプライマー107Aおよび107Cを用いて増幅し、結果として生じる1kbpのDNA断片をpTLV1へとクローニングして、01-28-1を与え、右側のアームをプライマー107Bおよび107Dを用いて増幅し、結果として生じる1kbpのDNA断片をpTLV1へとクローニングして、01-28-2を与えた。

【 0 1 5 8 】

適切な配列を生成してモジュール11のDHを突然変異させるために、左側のアームをプライマー108Aおよび108Cを用いて増幅し、結果として生じる1kbpのDNA断片をpTLV1へとクローニングして、01-28-3を与え、右側のアームをプライマー108Bおよび108Dを用いて増幅し、結果として生じる1kbpのDNA断片をpTLV1へとクローニングして、01-28-4を与えた。

【 0 1 5 9 】

各標的突然変異のための最終的なプラスミドの構築は、3断片連結を必要とする。相同性の標的の左右の領域を保有するPCR断片を含むプラスミドを適切な制限酵素で消化して、適切に消化したベクターpKC1139へと連結した (105ACについてはBamHI / KpnI、105BDについてはKpnI / HindIII、106ACについてはBamHI / EcoRI、106BDについてはEcoRI / HindIII、107ACについてはEcoRI / SpeI、107BDについてはHindIII / SpeI、108ACについてはEcoRI / SpeI、108BDについてはHindIII / SpeI)。連結反応を用いて、大腸菌DH5⁺を形質転換した。プラスミドDNAを制限消化によって分析した。ストレプトミセスの形質転換のために二重クロスオーバー事象をもたらす最終的なプラスミドをまず大腸菌s17-1へと形質転換した後、先の実施例9において説明したとおり、ストレプトミセスへと接合する。アパラマイシン耐性接合体をホモジナイズし、50 μg/mLアパラマイシンを補充したISP-4アガー培地へと画線し、37℃で、十分に増殖したコロニーに達するまで培養した。各々の一連の単一クローンを用いて、アパラマイシン30 μg/mLを補充した3mLのTSBプロスを接種して、37℃、250rpmで4日間振盪した。100 μLの培養物をISP-4アガーへと37℃で2~3日間延展して、第二のクロスオーバー事象を誘導した。単一のコロニーをアパラマイシンの有無の下で蒔種して、プラスミド骨格の損失を決定した。アパラマイシン選択性は、プラスミド配列の損失を示し、その表現型を有するコロニーをPCR後の各場合において増幅した断片の制限酵素消化によって分析して、DHドメインの突然変異を確認した。これらのDH突然変異体のPCR産物の制限酵素消化によって、突然変異とともに導入される制限部位に応じた2つの断片が与えられ、該制限部位は、野生型のものとは対照的である。先に説明した標準的な発酵条件下で株を増殖させ、所望の産物を産生することがわかった (図 6)。

【 0 1 6 0 】

(実施例15：経路特異的還元酵素 / カルボキシラーゼとしてのSfaRの特徴付け)

提唱された経路における通常ではない構築ブロック供給のためのSfaRの中心的な役割を実証するために、本発明者らは、まず、フレーム内欠失によってsfaRを失活させた。結果として生じる突然変異体は、SFAを産生する能力を完全に損失しており、sfaRが、SFA合成に必須の経路特異的ccrホモログとして機能することを示唆した (実施例16参照)。第二に、本発明者らは、N末端6×Hisタグ付きSfaRを異種性に発現させ、インビトロでの研究のためにほぼ均一になるよう精製した。期待されたとおり、NADPHおよび重炭酸塩の存在下で、クロトニル-S-CoA (図 7 の4) をSfaRによって、分路産物ブチリル-S-CoA (図 7 の7) とともに主要産物エチルマロニル-S-CoA (図 7 の5) へと効率的に変換した。反応混

10

20

30

40

50

合物において重炭酸塩を省略すると、クロトニル-S-CoAを結果的にブチリル-S-CoAへと還元した。クロトニル-S-CoAについては、 $K_m = 8.4 \times 10^{-4} \text{M}$ 、 $K_{\text{触媒反応}} = 6.8 \times 10^{-3} / \text{分}$ 、および $K_m / K_{\text{触媒反応}} = 1.2 \times 10^{-1} \text{M分}$ であった。反応がACPに関して直接的に生じる可能性を排除するために、SfaOをN末端6×Hisタグ付き誘導体として発現させおよび精製した。クロトニル-S-SfaOを基質として用いる試行は、SfaRの任意の活性を検出し損ない、SfaRが、ACPベースのクロトニル-S-SfaOよりもむしろ、CoAベースのクロトニル-S-CoAに関して活性を有するという証拠を提供した（図7の3）。第三に、SfaRの基質可動性を検出するために、本発明者らは、5炭素基質ペンテニル-S-CoAを合成した。興味深いことに、重炭酸の有無の条件下で、SfaRは、ペンテニル-S-CoAに関して還元および還元的カルボキシル化を迅速に行い（図7の8）、ペンタノイル-S-CoAおよびプロピルマロニルCoAをそれぞれ生成し（図7の10）、4炭素基質クロトニル-S-CoAにおける活性に匹敵する効率を示した。用いた条件下で、還元的カルボキシル化は、生じるのがあまりにも速すぎて、動態分析について測定できず；ペンタノイル-S-CoAを還元的に生成する上でのペンテニル-S-CoAについては、 K_m 、 $K_{\text{触媒反応}}$ 、および $K_m / K_{\text{触媒反応}}$ の値はそれぞれ、 $1.4 \times 10^{-3} \text{M}$ 、 $4.2 \times 10^{-2} / \text{分}$ 、および $= 3.4 \times 10^{-2} \text{M分}$ であった。

【0161】

（実施例16：sfaKの遺伝子欠失を結果として生じる遺伝子操作されたストレプトミセス属A92-309110（ストレプトミセス・フラベオルス）株の作出および新規の化合物の製造）

テンプレートとしてゲノムDNAまたはコスミドDNAを、ならびに1つのPCR産物（SfaK-Lと命名）を生成するためにプライマー対sfaK-L-for（配列番号64の配列）およびsfaK-L-r
ev（配列番号65の配列）を、その他のPCR産物（sfaK-Rと命名）を生成するためにプライ
マー対sfaK-R-for（配列番号66の配列）およびSfaK-R-rev（配列番号67の配列）を用いて、PCRを実施する。これらのPCR産物を単離し、次に制限酵素（sfaK-LにはEcoRIおよびBam
HIを用い、sfaK-RにはBamHIおよびHindIIIを用いる。）で消化し、次にEcoRIおよびHind
IIであらかじめ消化したpKC1139へと連結する。プラスミドpsfaKK0を単離する。

【0162】

所望の二重組換え株の作出を、先の実施例において説明したものと類似の手順を用いて実施する。大腸菌S17-1 / psfaKK0を用いて、ストレプトミセス属A92-309110（ストレプトミセス・フラベオルス）を接合により形質転換する。アブラマイシン耐性接合体をホモジナイズし、50 μg/mLアブラマイシンを補充したISP-4アガー培地へと画線し、37 °Cで、十分に増殖したコロニーに達するまで培養した。各々の一連の単一のコロニーを用いて、アブラマイシン30 μg/mLを補充した3mLのTSBプロスに接種して、37 °C、250rpmで4日間振盪する。100 μLの培養物をISP-4アガーに37 °Cで2～3日間延展して、第二のクロスオーバー事象を誘導する。37 °Cにおける二重クロスオーバー組換えを誘導した後、負のアブラマイシン表現型を有するコロニーを、PCRによる遺伝子型確認のために拾い出す。所望のPCR産物は、野生型のパターンとは異なる約1700bpである。sfaKを欠失している最終的な株をストレプトミセス属sfaKK0と命名する。

【0163】

ストレプトミセス属sfaKK0を、先に説明した標準的な発酵条件下で増殖させる。発酵プロスは、分子量1034.3のサングリフェリンに対応する新たなピークを含んでいることがわかり、生成物サングリフェリンXであると推定する。標準的な方法を用いて生成物を単離する。

【0164】

（引用文献）

【表 8】

Altschul, S. F., W. Gish, et al. (1990). "Basic local alignment search tool." J Mol Biol **215**(3): 403-10.

Banteli, R., J. Wagner, et al. (2001). "Synthesis of derivatives of the novel cyclophilin-binding immunosuppressant sanglifehrin A with reduced numbers of polar functions." Bioorg Med Chem Lett **11**(12): 1609-12.

10

Brown, E. J., M. W. Albers, et al. (1994). "A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex." Nature **369**(6483): 756-758.

Cheng, Y. Q., G. L. Tang, et al. (2003). "Type I polyketide synthase requiring a discrete acyltransferase for polyketide biosynthesis." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(6): 3149-54.

Clarke, S. J., G. P. McStay, et al. (2002). "Sanglifehrin A acts as a potent inhibitor of the mitochondrial permeability transition and reperfusion injury of the heart by binding to cyclophilin-D at a different site from cyclosporin A." J Biol Chem **277**(38): 34793-9.

20

- Fang, J., Y. Zhang, et al. (2008). "Cloning and characterization of the tetrocarcin A gene cluster from *Micromonospora chalcone* NRRL 11289 reveals a highly conserved strategy for tetrone biosynthesis in spirotetrone antibiotics." J Bacteriol **190**(17): 6014-25.
- Fehr, T., J. Kallen, et al. (1999). "Sanglifehrins A, B, C and D, novel cyclophilin-binding compounds isolated from *Streptomyces* sp. A92-308110. II. Structure elucidation, stereochemistry and physico-chemical properties." J Antibiot (Tokyo) **52**(5): 474-9. 10
- Fujimori, D. G., S. Hrvatin, et al. (2007). "Cloning and characterization of the biosynthetic gene cluster for kutznerides." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(42): 16498-503.
- Fujimori, D. G., S. Hrvatin, et al. (2007). "Cloning and characterization of the biosynthetic gene cluster for kutznerides." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(42): 16498-503.
- Gaesser, S., R. Lill, et al. (2001). "New erythromycin derivatives from *Saccharopolyspora erythraea* using sugar O-methyltransferases from the spinosyn biosynthetic gene cluster." Molecular Microbiology **41**(5): 1223-1231. 20
- Garneau, S., P. C. Dorrestein, et al. (2005). "Characterization of the formation of the pyrrole moiety during clorobiocin and coumermycin A1 biosynthesis." Biochemistry **44**(8): 2770-80.
- Handschumacher, R. E., M. W. Harding, et al. (1984). "Cyclophilin: a specific cytosolic binding protein for cyclosporin A." Science **226**(4674): 544-7.
- Hartel, C., P. Iblher, et al. (2006). "Immunosuppressive activity of the immunophilin-binding drug Sanglifehrin A in human whole blood: potent inhibition of interleukin-6 produced by lymphocytes and monocytes." Scand J Immunol **63**(1): 26-34. 30
- Huang, F., S. F. Haydock, et al. (2005). "The neomycin biosynthetic gene cluster of *Streptomyces fradiae* NCIMB 8233: characterisation of an aminotransferase involved in the formation of 2-deoxystreptamine." Org Biomol Chem **3**(8): 1410-8.
- Jia, X. Y., Z. H. Tian, et al. (2006). "Genetic characterization of the chlorothricin gene cluster as a model for spirotetrone antibiotic biosynthesis." Chem Biol **13**(6): 575-85. 40
- Kallen, J., R. Sedrani, et al. (2005). "Structure of human cyclophilin A in complex with the novel immunosuppressant sanglifehrin A at 1.6 Å resolution." J Biol Chem **280**(23): 21965-71.

Kazuo Umezawa, Y. I., Osamu Kawase, Hiroshi Naganawa and Shinichi Kondo (2001).

"Biosynthesis of polyoxypeptin A: novel amino acid 3-hydroxy-3-methylproline derived from isoleucine." J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1: 1550-1553.

Kieser, T., M. J. Bibb, et al., Eds. (1999). Practical Streptomyces Genetics, John Innes Foundation.

Li, T. L., F. Huang, et al. (2004). "Biosynthetic gene cluster of the glycopeptide antibiotic teicoplanin: characterization of two glycosyltransferases and the key acyltransferase." Chem Biol **11**(1): 107-19.

10

Liu, J., F. JD., et al. (1991). "Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes." Cell **66**(4): 807-815.

Liu, W., S. D. Christenson, et al. (2002). "Biosynthesis of the enediyne antitumor antibiotic C-1027." Science **297**(5584): 1170-3.

Maniatis, T., E. F. Fritsch, et al., Eds. (1998). Molecular Cloning. A Laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory.

20

Metternich, R., Denni, D., Thai, B, Sedrani, R. (1999). "Toward a Total Synthesis of the Immunosuppressant Sanglifehrin A. Preparation of Two Relay Compounds by Degradation and Their Use in the Reassembly of the Natural Product." J. Org. Chem. **64**: 9632-9639.

Miller, E. D., C. A. Kauffman, et al. (2007). J Org Chem **72**: 323-330.

Oliynyk, M., M. J. B. Brown, et al. (1996). "A hybrid modular polyketide synthase obtained by domain swapping." Chemistry & Biology **3**(10): 833-839.

30

Paquette, L. A., M. Duan, et al. (2002). "A convergent three-component total synthesis of the powerful immunosuppressant (-)-sanglifehrin a." J Am Chem Soc **124**(16): 4257-70.

Pemberton, T. J. and J. E. Kay (2003). "Cyclophilin sensitivity to sanglifehrin A can be correlated to the same specific tryptophan residue as cyclosporin A." FEBS Lett **555**(2): 335-40.

Pfeifer, B. A. and C. Khosla (2001). "Biosynthesis of polyketides in heterologous hosts." Microbiology and Molecular Biology Reviews **65**(1): 106-118.

40

Powell, J. D. and Y. Zheng (2006). "Dissecting the mechanism of T-cell anergy with immunophilin ligands." Curr Opin Investig Drugs **7**(11): 1002-7.

- Rawlings, B. J. (2001). "Type I polyketide biosynthesis in bacteria (Part A-erythromycin biosynthesis)." Nat Prod Rep **18**(2): 190-227.
- Rawlings, B. J. (2001). "Type I polyketide biosynthesis in bacteria (Part B)." Natural Product Reports **18**(3): 231-281.
- Sambrook, J. and D. Russel, Eds. (2001). Molecular Cloning: A laboratory manual (third edition), Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanglier, J. J., V. Quesniaux, et al. (1999). "Sanglifehrins A, B, C and D, novel cyclophilin-binding compounds isolated from Streptomyces sp. A92-308110. I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological activity." J Antibiot (Tokyo) **52**(5): 466-73. 10
- Schreiber, S. (1991). "Chemistry and biology of the immunophilins and their immunosuppressive ligands." Science **251**(4991): 283-287.
- Sedrani, R., J. Kallen, et al. (2003). "Sanglifehrin-cyclophilin interaction: degradation work, synthetic macrocyclic analogues, X-ray crystal structure, and binding data." J Am Chem Soc **125**(13): 3849-59. 20
- Sheehan, L. S., R. E. Lill, et al. (2006). "Engineering of the Spinosyn PKS: Directing Starter Unit Incorporation." J Nat Prod **69**(12): 1702-10.
- Sokolskaja, E., D. M. Sayah, et al. (2004). "Target cell cyclophilin A modulates human immunodeficiency virus type 1 infectivity." J Virol **78**(23): 12800-8.
- Staunton, J. and K. J. Weissman (2001). "Polyketide biosynthesis: a millennium review." Natural Product Reports **18**(4): 380-416. 30
- Staunton, J. and B. Wilkinson (2001). "Combinatorial biosynthesis of polyketides and nonribosomal peptides." Current Opinion in Chemical Biology **5**(2): 159-164.
- Steinschulte, C., T. Taner, et al. (2003). "Cutting edge: sanglifehrin A, a novel cyclophilin-binding immunosuppressant blocks bioactive IL-12 production by human dendritic cells." J Immunol **171**(2): 542-6.
- Umezawa, K., Y. Ikeda, et al. (2001). J Chem Soc Perkin Trans 1: 1550-1553. 40
- Watashi, K., N. Ishii, et al. (2005). "Cyclophilin B is a functional regulator of hepatitis C virus RNA polymerase." Mol Cell **19**(1): 111-22.
- Zander, K., M. P. Sherman, et al. (2003). "Cyclophilin A interacts with HIV-1 Vpr and is required for its functional expression." J Biol Chem **278**(44): 43202-13.

Zenke, G., U. Strittmatter, et al. (2001). "Sanglifehrin A, a novel cyclophilin-binding compound showing immunosuppressive activity with a new mechanism of action." J Immunol **166**(12): 7165-71.

Zhang, L. H. and J. O. Liu (2001). "Sanglifehrin A, a novel cyclophilin-binding immunosuppressant, inhibits IL-2-dependent T cell proliferation at the G1 phase of the cell cycle." J Immunol **166**(9): 5611-8.

Zhang, L. H., H. D. Youn, et al. (2001). "Inhibition of cell cycle progression by the novel cyclophilin ligand sanglifehrin A is mediated through the NFkappa B-dependent activation of p53." J Biol Chem **276**(47): 43534-40.

10

【 0 1 6 5 】

本明細書および後に続く特許請求の範囲を通じて、文脈が別段に必要としない限り、語「を含む (comprise)」ならびに「を含む (comprises)」および「を含んでいる」などの変形は、記載された完全体 (integer)、完全体の群、または工程の群を包含することを含意するよう理解されるであろうが、任意の他の完全体、工程、完全体の群、または工程の群を排除するものではない。

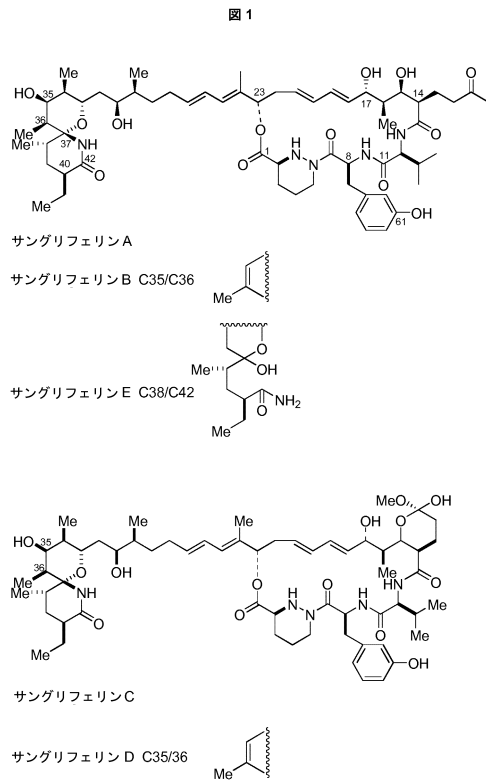
20

【 0 1 6 6 】

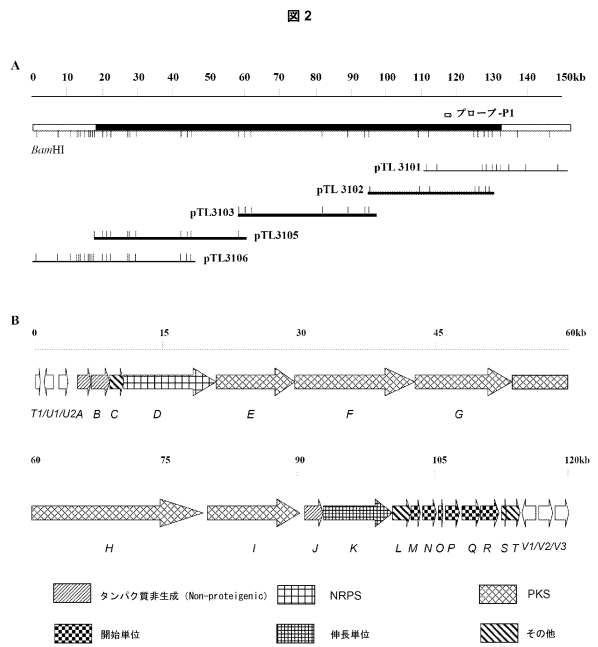
本発明の明細書を通じて言及されたすべての特許および特許出願は、それらのすべての内容が全体として引用により本明細書に組み込まれる。

本発明は、先に引用した好ましいおよびより好ましい群ならびに適切なおよびより適切な群ならびに群の実施態様のすべての組み合わせを包含する。

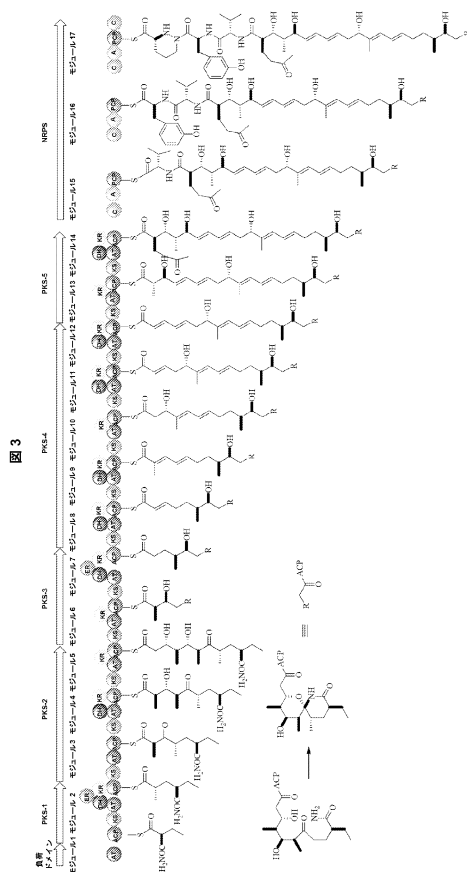
【図 1】



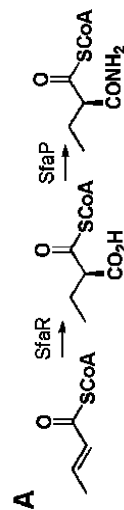
【図 2】



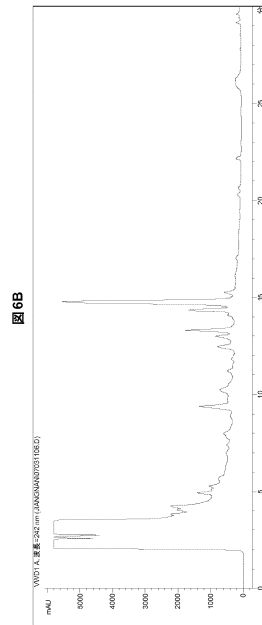
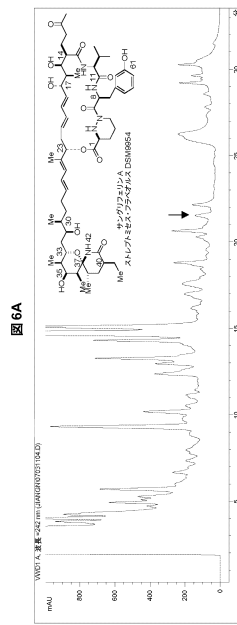
【図 3】



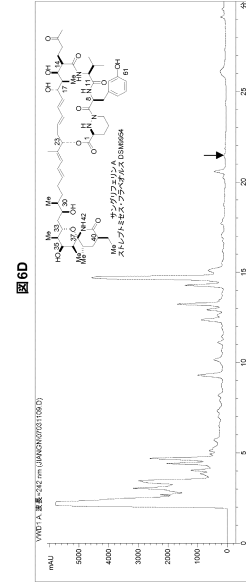
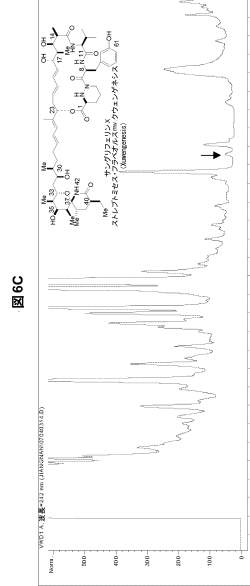
【図 4 A】



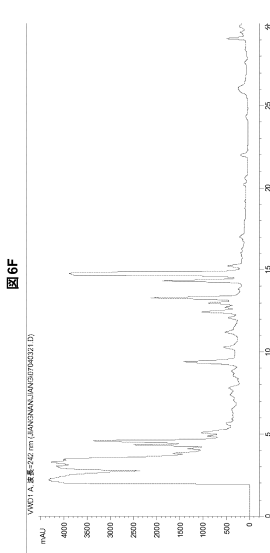
【図 6 A - B】



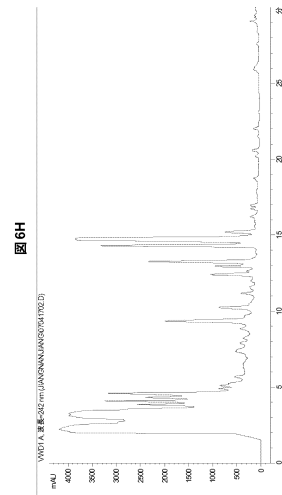
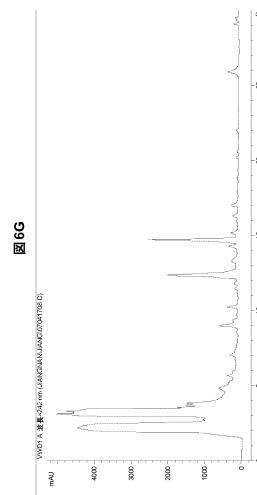
【図 6 C - D】



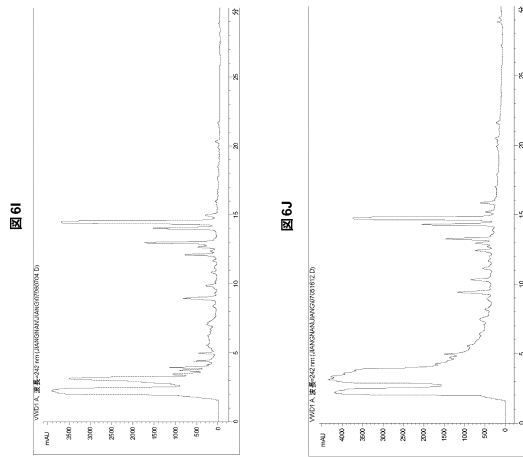
【図 6 E - F】



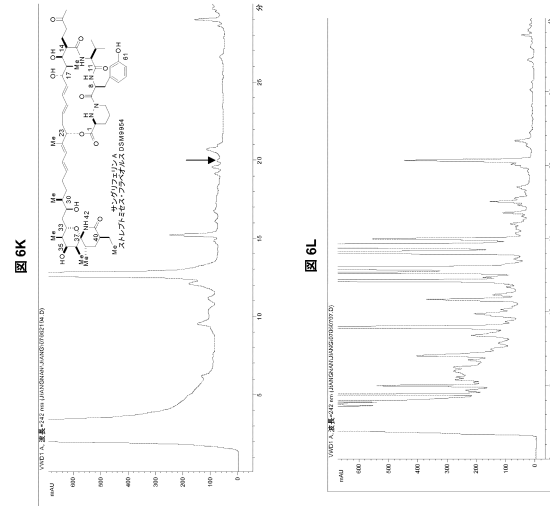
【図 6 G - H】



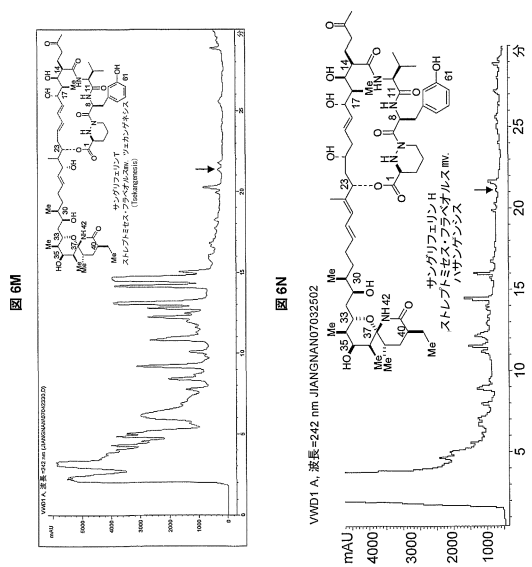
【図 6 I - J】



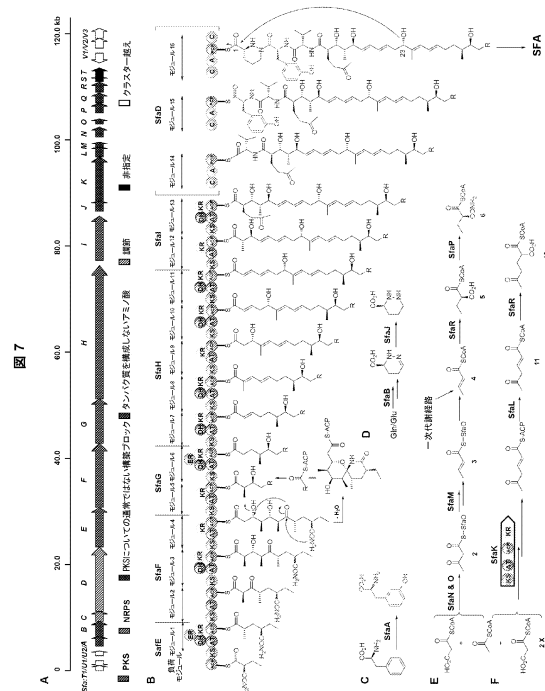
【図 6 K - L】



【図 6 M - N】



【図 7】



【配列表】

0005789190000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

C 1 2 P	17/16	(2006.01)	C 1 2 P	17/16	
C 1 2 N	9/00	(2006.01)	C 1 2 N	9/00	
C 1 2 P	21/02	(2006.01)	C 1 2 P	21/02	C
C 1 2 P	21/04	(2006.01)	C 1 2 P	21/04	
C 0 7 K	5/033	(2006.01)	C 0 7 K	5/033	
C 0 7 K	5/083	(2006.01)	C 0 7 K	5/083	
C 0 7 K	5/12	(2006.01)	C 0 7 K	5/12	
C 0 7 K	14/195	(2006.01)	C 0 7 K	14/195	
A 6 1 K	38/00	(2006.01)	A 6 1 K	37/02	
A 6 1 P	37/06	(2006.01)	A 6 1 P	37/06	
A 6 1 P	31/12	(2006.01)	A 6 1 P	31/12	
A 6 1 P	9/00	(2006.01)	A 6 1 P	9/00	

(72)発明者 クウドング クウ

中華人民共和国 2 0 0 0 3 2 シャンハイ 3 4 5 ルイングルイング ロード

審査官 長谷川 茜

(56)参考文献 特表平 1 1 - 5 0 9 0 9 2 (J P , A)

J. AM. CHEM. SOC. , 2 0 0 3 年 , Vol.125 , pp.3849-3859

The Journal of Antibiotics , 1 9 9 9 年 , Vol.52, No.5 , pp.466-473

The Journal of Antibiotics , 1 9 9 9 年 , Vol.52, No.5 , pp.474-479

Chemistry & Biology , 2 0 0 4 年 , Vol.11 , pp.357-366

APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY , 2 0 0 6 年 , Vol.72, No.4 , pp.2573-2580

Gene , 2 0 0 0 年 , Vol.251 , pp.81-90

Nat. Prod. Rep. , 2 0 0 8 年 2 月 , Vol.25 , pp.25-34

Angew. Chem. Int. Ed. , 2 0 0 5 年 , Vol.44 , pp.4757-4760

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0

C A p l u s / M E D L I N E / B I O S I S / W P I D S (S T N)

G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)